Studien zur Rolle von Hydroxysuccinimid bei Peptidsynthesen mit Dicyclohexyl-carbodiimid

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Kurt Hofer
aus Strengelbach (AG)

Basel 1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0003

Studien zur Rolle von Hydroxysuccinimid bei Peptidsynthesen mit Dicyclohexyl-carbodiimid

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Kurt Hofer
aus Strengelbach (AG)

Basel 1970

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel

auf Antrag

der Herren Professoren

Dr. M. Brenner und Dr. C.A. Grob

Basel, den 10. Februar 1970

Prof. Dr. S. Fallab

Dekan

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. M. Brenner

im Institut für organische Chemie der Universität

Basel ausgeführt.

Herrn Professor Dr. M. Brenner möchte ich für seine stete Hilfe und das Interesse, das er dieser Arbeit entgegenbrachte, herzlich danken.

Meinen lieben Eltern gewidmet.

I N H A L T

Seite

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung 1

2. Gängige Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung . 2

2.1. DCCI als wasserentziehendes Mittel . 2

2.2. Aminolyse von Hydroxylaminderivaten. 4

3. Das Wünsch-Verfahren. 6

3.1. Ergebnisse des Wünsch-Verfahrens. 6

3.2. Ein Nebenprodukt der Wünsch-Reaktion. 9

4. Hypothesen zum Reaktionsmechanismus. 17

4.1. Hypothese 1: Antiparalleles Assoziat und HOSu als Protonendonator. 19

4.2. Hypothese 2a: Aminolyse von HOSu zur Hydroxamsäure und Anhydridbildung mit R-COOH·DCCI. 20

4.3. Hypothese 2b: Aminolyse eines HOSu·DCCI-Adduktes und N-O-Spaltung unter Bildung eines gem. Anhydrids. 22

4.4. Hypothese 3: Konzertierte Reaktion eines Peptidkomponenten-Assoziats mit einem HOSu·DCCI-Addukt. 25

5. Experimentelle Ueberprüfung der Hypothesen. 29

5.1. Assoziationsuntersuchungen. 29

5.2. Isotopenmethode. 38

5.3. Zur Protonierung von O-Acyl-Lactimen und Isoharnstoffen durch HOSu. 40

5.4. Die Ringöffnung von HOSu durch Nucleophile. 42

5.5. Die Adduktbildung von HOSu und DCCI. 43

5.6. Die Umlagerungsfähigkeit von Modellverbindungen. 44

5.6.1. Das Bernsteinsäure-Essigsäure-Benzylamin-Modell (ZP 1) und das isomere Modell (ZP 2). 47

5.6.2. Das Phthalsäure-Essigsäure-Benzylamin-Modell (ZP 3). 52

5.6.3. Das Bernsteinsäure-Laurinsäure-Dodecylamin-Modell (ZP 4). 54
5.6.4. Das Bernsteinsäure-Z-$(Gly)_3OH$ - $H-(Gly)_3OtBu$ - Modell (ZP 5). 57
5.6.5. Versuche mit ACTH-Peptidsequenzen. 60
6. Diskussion. 61
7. Die Synthese der Modell-Zwischenprodukte. 65
7.1. Synthese des ZP 1. 65
7.2. Synthese des ZP 2. 68
7.3. Reaktionen mit ZP 1 und ZP 2. 69
7.4. Synthese des ZP 3. 72
7.5. Synthese des ZP 4. 74
7.6. Synthese des ZP 5. 75
7.7. Syntheseversuche mit ACTH-Peptidsequenzen (ZP 6). 76
7.8. Succinyl-aminosäure-ester. 81

EXPERIMENTELLER TEIL

8. Verzeichnis der Abkürzungen. 84
9. Allgemeines. 85
10. Selbstzersetzung von N-Hydroxysuccinimid. 87
11. Leitfähigkeitsversuche. 88
11.1. Ausgangsprodukte. 88
11.2. Konduktometrische Titration von N,N'-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff mit 0,5 m-HOSu in THF. 88
11.3. Konduktometrische Verfolgung der DCCI-Kupplung von TFA-L-Val-OH mit H-L-Val-OMe mit und ohne HOSu-Zusatz und der Reaktion von HOSu mit DCCI. 90
12. Versuche zum Nachweis von Assoziaten. 91
12.1. MG-Bestimmungsversuche an H-ACTH-11-24-OtBu·$3HCl·6H_2O$ in Wasser und Methanol und an Z-ACTH-11-16-OMe und Z-ACTH-5-7(NO_2)-10-OMe in DMF. 91

12.2. Viskositätsmessungen an wässrigen Lösungen von H-ACTH-11-24-OtBu·3HCl·6H_2O. 93
12.3. Osmometrische Differenzmessungen im System Z-ACTH-7-10-OH/H-Met-OiProp/HOSu. 95
13. Das Reaktionsprodukt aus HOSu und DCCI (Succinimido-oxycarbonyl-β-alanin-hydroxysuccinimidester). 98
14. Das Gleichgewicht zwischen HOSu und Benzylamin. 100
15. Vorversuche zur O^{18}-Markierung von BOC-ACTH-1-10-OH. 101
16. Synthese der Modellzwischenprodukte. 102
16.1. Synthese des ZP 1. 102
16.1.1. Bernsteinsäure-monobenzylamid. 102
16.1.2. Bernstein-4-benzylamid-1-methylester. 102
16.1.3. N-Benzylsuccinimid. 103
16.1.4. Freisetzen von Hydroxylamin aus dem Hydrochlorid. 103
16.1.5. Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure. 104
16.1.6. Bernstein-4-benzylamid-1-(O-acetyl-)-hydroxamsäure = ZP 1. 105
16.2. Succinyl-aminosäure-ester. 106
16.2.1. Succinyl-glycin-methylester. 106
16.2.2. Succinyl-L-valin-methylester. 108
16.3. Synthese des ZP 2 109
16.3.1. Saures Kaliumsalz der Acethydroxamsäure. 109
16.3.2. Freisetzen der wasserfreien Acethydroxamsäure aus dem sauren Kaliumsalz mit Weinsäure. 109
16.3.3. O-[N'-(Benzylamido-)-bernstein-]acethydroxamsäure = ZP 2 110
16.4. Identifikationsreaktionen mit den ZP 1 u.ZP 2. 111
16.5. Produkte der thermischen Umlagerung von ZP 1 und ZP 2. 113
16.6. Synthese des ZP 3 . 114
16.6.1. N'-Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure. 114
16.6.2. N'-Benzyl-phthalamid-O-(acetyl-)-hydroxamsäure = ZP 3. 115
16.7. Synthese des ZP 4. 117

16.7.1. Bernsteinsäure-monododecylamid. 117
16.7.2. Bernstein-4-dodecylamid-1-methylester. 117
16.7.3. Bernstein-4-dodecylamid-1-hydroxamsäure. 117
16.7.4. Bernstein-4-dodecylamid-1-(O-lauroyl-)-hydroxamsäure = ZP 4 118
16.8. Synthese des ZP 5 119
16.8.1. Glycyl-glycyl-glycin-tert.butylester 119
16.8.2. Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-glycin 120
16.8.3. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-säure 120
16.8.4. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-methylester 121
16.8.5. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-hydroxamsäure 121
16.8.6. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-[O-(carbobenzoxy-triglycyl-)]-hydroxamsäure = ZP 5. 122
16.9. Versuche mit ACTH-Peptidsequenzen 123
17. Die Umlagerungen der ZP 1 - 5 127
18. Spektren 131
Zusammenfassung 133
Literaturverzeichnis 134
Curriculum vitae 138

THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

Bei der Verknüpfung von Aminosäuren oder Peptiden treten bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeiten und -produkte immer wieder unerwartete Phänomene auf, die sich nicht ohne weiteres erklären lassen. Ein aktuelles Beispiel bietet die verbesserte Dicyclohexylcarbodiimid-(DCCI *)-Kupplung unter Zusatz von N-Hydroxysuccinimid, wie sie von Wünsch (24) beschrieben worden ist.

Mit der Entdeckung von Wünsch besitzt der Peptidchemiker das zur Zeit wahrscheinlich beste Verfahren zur Verknüpfung von grösseren Peptidfragmenten (Iselin, 34). Sie erfüllt die folgenden Hauptforderungen an eine Kupplungsmethode in vielen Fällen beinahe optimal:

- Ausbeute nahe an 100 %
- keine unerwünschten Nebenprodukte (insbesondere Racemate und Acylharnstoffe)
- einfache Isolierung des Produkts von Begleitstoffen
- einfache praktische Ausführung

Beim Studium der vorliegenden Erfahrungen gelangt man zur Erkenntnis, dass die in der Literatur diskutierten Mechanismen als Interpretationsgrundlage nicht genügen. Deshalb werden im Folgenden neue Hypothesen aufgestellt und einige davon experimentell überprüft.

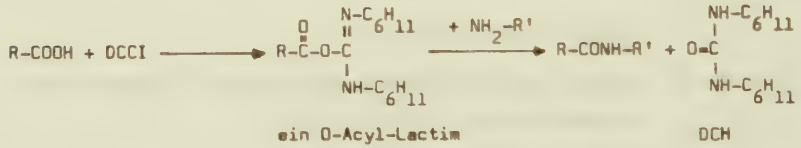
(*) DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid
DCH = Dicyclohexyl-harnstoff
Abkürzungen nach Empfehlung des Komitees des 5. Europ. Pept. Symp. Oxford, 1962

2. Gängige Methoden zur Knüpfung der Peptidbindung

2.1 DCCI als wasserentziehendes Mittel

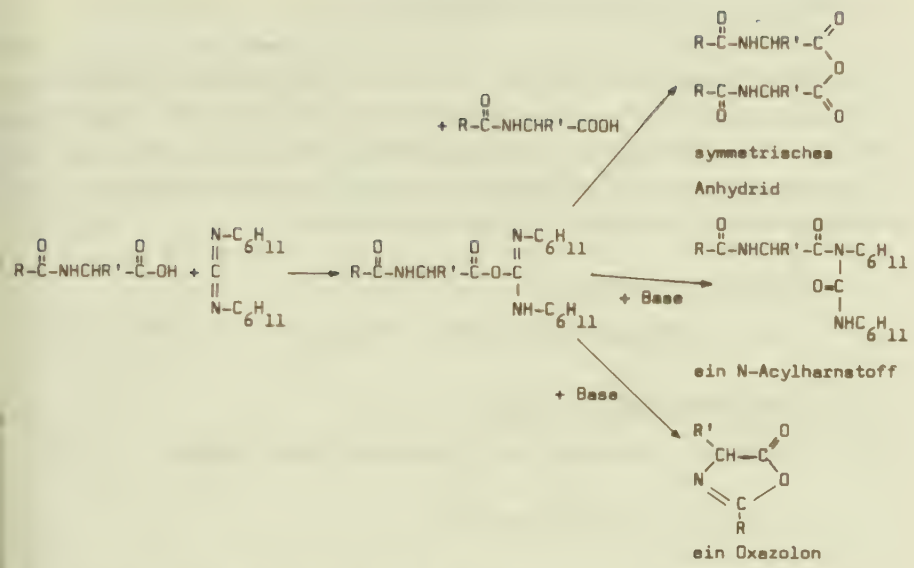
DCCI (1, 2, 3, 4) ist unter anderem anwendbar zur Darstellung von Pyrophosphorsäureestern (6) (11), Carbonsäureestern (4), Arylalkyläthern (31) (5), Anhydriden (2) und Amiden (3, 14). Es ist das in der Peptidverknüpfungstechnik am häufigsten (25) angewandte Reagens.

In den meisten dieser Arbeiten finden sich auch Beiträge zum Mechanismus der Reaktion. Für die Bildung eines Amids aus einer Carbonsäure und einem Amin wird eine primäre Aktivierung der Säure durch das DCCI postuliert:



Das hypothetische O-Acyl-Lactim soll weiter über einen nucleophilen Angriff des Amins in das Amid und Dicyclohexylharnstoff (DCH) übergehen (6).

Wichtige Nebenprodukte, die bei Peptidsynthesen stören, sind symmetrische Anhydride, N-Acylharnstoffe, und, wenn man von Acylpeptiden oder acylierten Aminosäuren ausgeht, Oxazolone (Azlactone



Symmetrische Anhydride von Acylaminosäuren bilden sich entweder in Abwesenheit oder bei sterischer Hinderung der Aminkomponente. Sie brauchen aber, da sie ihrerseits Acylierungsmittel sind, die Gesamtreaktion prinzipiell nicht zu stören (2, 4). Da sie indessen während ihrer Synthese oder Aminolyse racemisieren können, entstehen auf diesem Wege eventuell optisch uneinheitliche Produkte (7).

Dasselbe gilt für die Oxazolone (7, 8, 9)

Die Bildung der N-Acylharnstoffe ist basenkatalysiert (10, 11, 12, 4). Sie haben praktisch keine acylierenden Eigenschaften mehr, vermindern somit die Ausbeute und erschweren die Reindarstellung des gewünschten Produktes.

Welche der Nebenprodukte sich bilden ist unter anderem abhängig von der gewählten N-Schutzgruppe (4, 7).

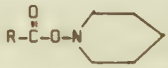
Zusammenfassend muss man also feststellen, dass die "klassische" DCCI-Kupplungsmethode, trotz mancher Vorteile, bezüglich der Racemisierung und der auftretenden Nebenprodukte die Forderungen der Peptidchemiker noch nicht erfüllt.

2.2 Aminolyse von Hydroxylaminderivaten

Ebenfalls seit einiger Zeit bekannte Wege der Aktivierung von Acylaminosäuren zur Peptidsynthese führen über die Bildung der gemischten Anhydride oder aktivierten Ester (13, 14). Die wichtigsten, speziell von Hydroxylaminderivaten ausgehenden Methoden seien im Folgenden kurz aufgeführt:

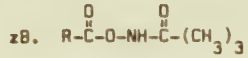
a) Hydroxylaminester

- Die N-Hydroxypiperidinester (Young, 15)



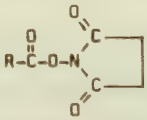
b) Hydroxamsäure-anhydride

- Gemischte Anhydride mit Hydroxamsäuren (Rjappa, 16, 17)

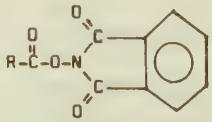


Die folgenden Derivate sind ihrer Chemie nach eigentlich auch gemischte Anhydride und zwar mit N,N-disubstituierten Hydroxamsäuren, werden in der Literatur aber meist als Ester bezeichnet:

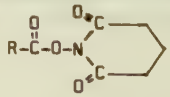
- N-Hydroxysuccinimid-Ester (HOSu-Ester, Anderson, 18)



- N-Hydroxyphthalimidester (HOPhth-Ester, Nefkens, 20, 21)



- N-Hydroxyglutarimidester (Jeschkeit, 19)



Peptidsynthesen nach all diesen Methoden erfolgen also in zwei Stufen: zunächst wird die Säure in ihre aktivierte Form gebracht und diese dann, eventuell nach einer vorherigen Reinigungsoperation, der Aminolyse unterworfen. Es ist oft möglich, den Racemisierungsgrad von so gekuppelten Peptiden unter die messtechnisch zur Zeit erfassbaren Grenze von 1 - 2% abzusenken (28, 29).

3. Das Wünsch-Verfahren

Wünsch hatte die Idee, die Methoden 2.1 und 2.2. der vorigen Kapitel zu kombinieren (24, 23).

In einer typischen praktischen Vorschrift werden je ein Aequivalent Peptidsäure und Peptidbase und ein bis zwei Aequivalente Hydroxysuccinimid (HOSu) in einem inerten Lösungsmittel (Methylenchlorid, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid) gelöst und bei 0 - 20°C mit einem Aequivalent DCCI versetzt. Die Reaktionslösungen sind meistens frei von Acylharnstoff und liefern in guter Ausbeute ein weitgehend optisch einheitliches Material.- Eine solche Peptidkupplung wird im Folgenden als Wünsch-Kupplung, Wünsch-Verfahren oder Wünsch-Reaktion bezeichnet.

Auf die Erfahrungen mit diesem neuen und schon häufig, beispielsweise auch für Peptidsynthesen an einem festen Träger (27) angewandten Verfahren soll nun näher eingegangen werden.

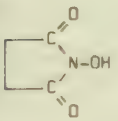
3.1. Ergebnisse des Wünsch-Verfahrens

Der Racemisierungsgrad kann bei Verwendung von DCCI allein (klassisches Verfahren), je nach angewandter Testmethode, sehr hohe Werte erreichen:

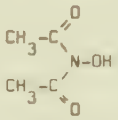
		% Inversion:
Z-Leu-Phe-OH + H-Val-OtBU	Weygand (28)	5-10%, je na Temp. und
TFA-Pro—Val-OH + H-Pro-OCH_3	Weygand (29)	
Z-Gly-Phe-OH + H-Gly-O-Et	Anderson-Test (30)	4%
Bz-Leu-OH + H-Gly-O-Et	Young-Test (30)	40%

Der Zusatz von 1 - 2 Aequivalenten HOSu nach Wünsch lässt in allen Fällen die Inversion unter 1 - 2 % sinken. Parallel dazu fällt der Gewichtsanteil an Acylharnstoff im Endprodukt von z.B. 15 % auf praktisch null (23, 28, 59). Bezüglich der Racemisierung erhält man etwa die gleich guten Werte, wenn man von den N-Hydroxysuccinimidestern der entsprechenden Peptidsäuren ausgeht (28; Anderson-Methode, vgl.Kap. 2.2)

Wünsch fand mit N-Hydroxyphthalimid und Stickstoffwasserstoffsäure als Zusätze etwa gleich gute Werte bezüglich Acylharnstoffanteil und Racemisierung wie für HOSu. Die beiden Verbindungen sind allerdings in der Praxis aus Sicherheits- und reinigungstechnischen Gründen weniger gut geeignet. Dagegen fand er keine vergleichbare Wirkung bei Zusatz von Phenol, p-Nitrophenol oder N-Hydroxy-bis-acetimid (33).



HOSu



N-Hydroxy-bis-acetimid

Die letztgenannte Verbindung weist dieselbe funktionelle Gruppierung auf wie HOSu, ist aber nicht zum Ring geschlossen.

Anderson und Zimmermann untersuchten eine Reihe von weiteren Zusätzen, die üblicherweise als aktivierte Esterderivate eingesetzt werden, auf ihre Wirksamkeit und fanden einen günstigen Einfluss von N-Hydroxypiperidin und N-Hydroxyphthalimid, keinen Effekt hingegen bei 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol, 8-Oxychinolin, p-Nitrophenol und Pivalinsäure (30).

Wünsch berichtet ferner, dass das Auskristallisieren des DCH bei der klassischen DCCI-Methode schneller erfolge als in Gegenwart von HOSu (33). Trotzdem scheint der Reaktionsablauf durch HOSu beschleunigt zu werden. Dies konnte durch eigene Versuche anhand einer konduktometrischen Verfolgung der Kupplung von TFA-Val-OH mit H-Val-OCH_3 gezeigt werden: Die Leitfähigkeitsänderung z.B. eine halbe Stunde nach Reaktionsbeginn ist auf Zusatz von HOSu fast doppelt so gross (vgl. Kap.11.3).

Iselin beobachtete, dass die Basenkomponente schneller aus dem Reaktionsgemisch verschwindet als die Säurekomponente (34).

Die ersten bemerkenswerten Ergebnisse wurden bei der Kupplung der Glucagon Teilsequenz 22-26 mit der Sequenz 27-29 gefunden (24) Neben dem Verschwinden der N-Acylharnstoffe wird hier vor allem der Ausbeutezuwachs von 31 % (klassische DCCI-Kupplung) auf 75 % vermerkt. Wünsch (33) fand weiter und Iselin (34) bestätigt, dass im allgemeinen die Wirkung des HOSu bei der Kupplung grösserer Peptide deutlicher ist als bei der Kupplung von kleinen Peptiden oder von Aminosäuren. Beispiele finden sich in 23, 28, 29 und 59. Allerdings soll der Effekt auch bei grossen Peptiden von der Sequ abhängig sein. Dies könnte darauf hinweisen, dass Struktureffekte (Assoziationen) eine besondere Rolle spielen und diese Interpretation wird durch die Beobachtung gestützt, dass Komponenten, die in einem Lösungsmittel schlecht löslich sind, auf Zusatz von HOSu oder Harnstoff in Lösung gehen (33).- Wir fanden anderseits, dass die N-geschützte ACTH-Teilsequenz 7-10 allein in DMF bei 20° sehr schlecht, auf Zusatz von HOSu aber rasch in Lösung geht.

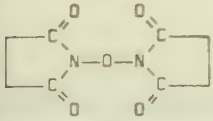
Wünsch stellte weiter fest, dass Wünsch-Kupplungen zwischen grossen Komponenten r a s c h e r ablaufen als der Umsatz der v o r g e b i l d e t e n HOSu - E s t e r mit den zugehörigen Aminkomponenten.

.2. Ein Nebenprodukt der Wünsch-Reaktion

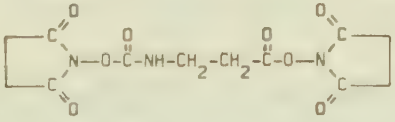
Lässt man HOSu mit DCCI in absolutem THF bei 20°C reagie-
en, so beginnt nach einigen Stunden DCH auszukristallisieren.
as Dünnschichtchromatogramm (DC) der Kristallmasse verrät neben
CH noch die Anwesenheit einer stark UV-absorbierenden und pola-
en Verbindung. Ihre Isolierung gelingt durch Extraktion des DCH
m Soxhlet und Umkristallisieren des Rückstandes aus abs. THF;
ie schmilzt bei 156 - 163° (Gross, 46) bzw. 172 - 174° (diese
rbeit).

Es erhebt sich nun die Frage, ob diese Verbindung als Kupp-
ungsagens auftreten oder derart in den Mechanismus einer Wünsch-
upplung eingreifen kann, dass damit die Vorteile dieser Methode
rklärt werden können.

Für die Verbindung vom angegebenen Schmelzpunkt schlugen Löw
nd Kisfaludy (45) die Struktur 1 vor, während in einer kürzlich
rschienenen Publikation Gross und Bilk (46) die Struktur 2 vor-
iehen.



1



2

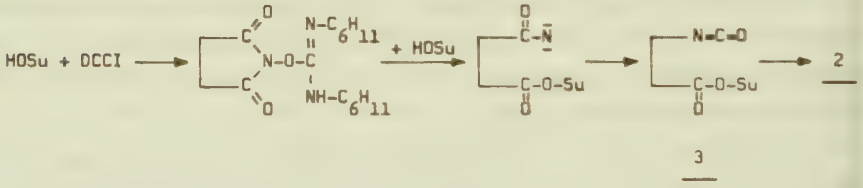
Auf Grund der Analysenwerte kann keine Entscheidung zwischen
ruktur 1 und 2 getroffen werden, da die berechneten Werte für
ide Möglichkeiten recht nahe beieinanderliegen. Darüberhinaus
isen die gemessenen Prozentzahlen eine durch die Unstabilität
r Verbindung erhöhte Streuung auf.

Eigene Untersuchungsergebnisse führen zu folgendem Resultat:

Das IR-Spektrum der Verbindung vom Smp. 172 - 174° zeigt eine
arke Aehnlichkeit mit jenem von HOSu. Der auffälligste Unter-
hied besteht im Fehlen der starken, infolge Assoziation breiten
-Valenzbande des HOSu bei ca. 3000 cm^{-1}. Statt dessen findet man

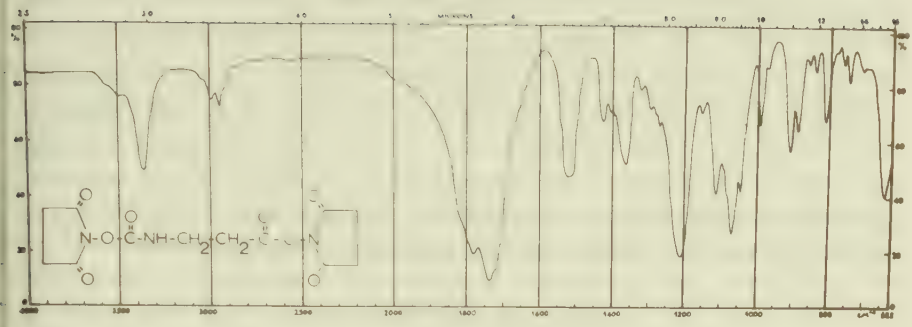
neu bei 3360 cm^{-1} eine relativ scharfe Bande, die zusammen mit einer ebenfalls neu auftretenden Bande bei 1520 cm^{-1}, der primären Amidgruppe der Struktur 2 zugeordnet werden kann. Als Carbonyl-Valenzbanden erkennt man, wie bei HOSu, die für Succinimide typischen Doppelbanden bei 1740 cm^{-1} und 1780 cm^{-1}. Dies wären Argumente für Struktur 2.

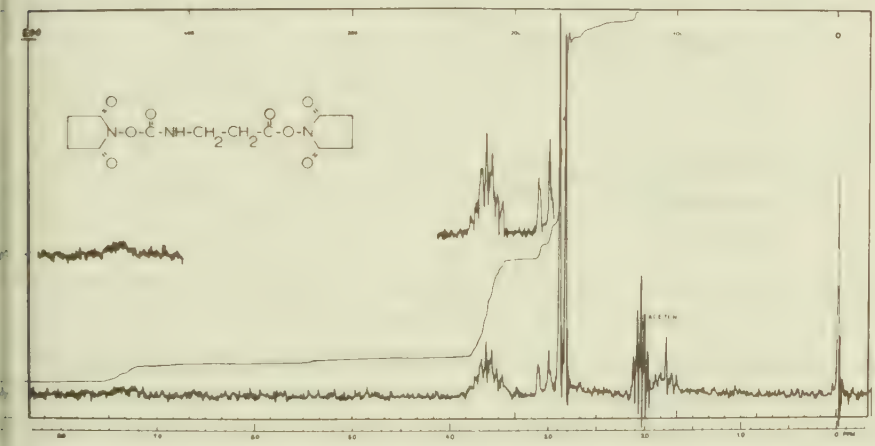
Als Bildungsmechanismus für 2 vermutet Gross nachstehende Reaktionsfolge mit dem Isocyanat 3 als Zwischenprodukt:

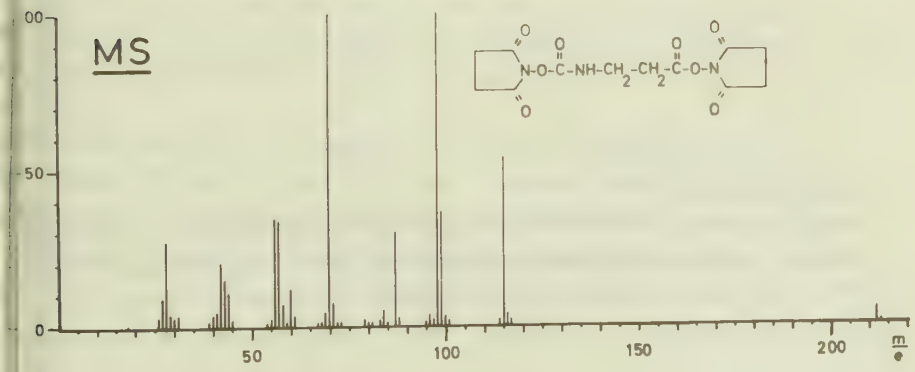


IR-Spektren des Reaktionsmilieus zeigen indessen zu keinem Zeitpunkt die typische starke Isocyanatbande bei 2200 - 2300 cm^{-1}. Dieser Befund besagt allerdings nur, dass nie eine merkliche Konzentration an Isocyanat vorliegt.

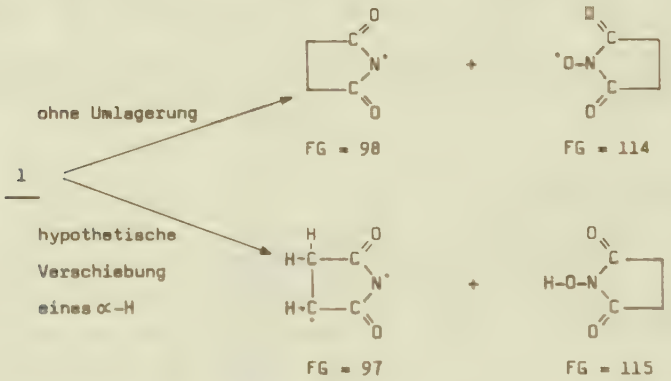
Das NMR-Spektrum der Verbindung in Aceton zeigt 2 Singletts bei 2,83 und 2,90 ppm im Verhältnis 1:1, die auf die Anwesenheit von zwei HOSu-Gruppierungen hinweisen, ein Sextett bei 3,61 ppm, das auf D_2O-Zusatz langsam in ein Triplett überzugehen scheint, wahrscheinlich ein Triplett bei 3,01 ppm sowie eine breite Bande bei 7,35 ppm, die ebenfalls auf Zusatz von D_2O verschwindet. Auffallend ist, dass das Integralverhältnis der drei letztgenannten Bandengruppen bei Spektren verschiedener Substanzproben nicht konstant ist, was auf Neben- oder Folgeprodukte hinweisen würde. Vernachlässigt man diese letzte Feststellung, so liessen sich diese Banden allerdings als Amid-NH- mit zwei benachbarten Methylengruppen (Strukturelement des β-Alanins) deuten. Dies würde ebenfalls auf die Struktur 2 hinweisen.



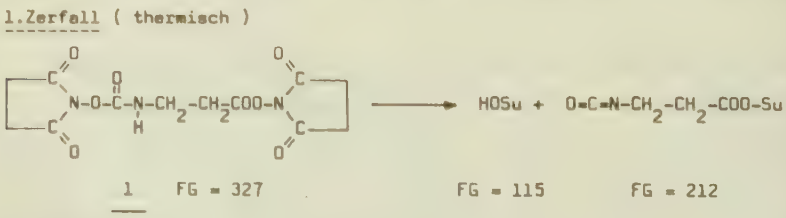



MS
100
50
0
50
100
150
200
m/e

Das Massenspektrum der Verbindung vom Smp. 172 - 174° zeigt als massenhöchstes Ion einen $\frac{m}{e}$ - Peak bei 212 (*). Dies ist das Formelgewicht der Struktur 1. Die Struktur 2 besitzt ein solches von 327; an dieser Stelle ist im MS aber auch bei grösster Empfindlichkeit kein über das Grundrauschen ragender Peak nachweisbar. Die ersten Zerfallsprodukte liegen bei $\frac{m}{e}$ = 115 und 98. Diese passen nun schlecht auf einen Zerfall von 1, denn auch bei Annahme einer der vielen in der MS möglichen Umlagerungen und H-Verschiebungen müsste man andere Zerfallsprodukte erwarten:



Sowohl bei $\frac{m}{e}$ = 114 und 97 sind aber nur relativ schwache Peaks zu finden. Also liegt eher ein von der Struktur 2 abgeleiteter Zerfallsmechanismus folgender Art nahe,



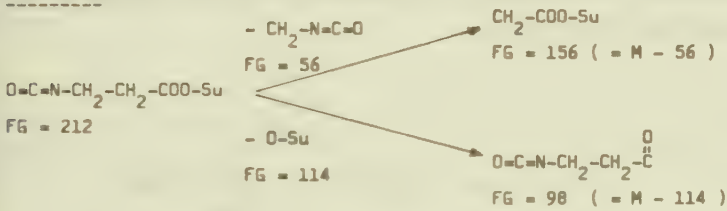
(*) Das Vergleichs-Massenspektrum einer Substanzprobe von H.Gross zeigte allerdings daneben noch einen Peak variabler Intensität bei $\frac{m}{e}$ = 218 und mehrere Zerfallsprodukte zwischen 115 und 212. Dies könnte eventuell auf Neben- oder Folgeprodukte zurückzuführen sein.

wobei allerdings diese erste Spaltung durch die thermische Anregung in der Messapparatur (140-150°C) zu 100 % erfolgen müsste.

Dass eine solche Spaltung thermisch erfolgt und dabei ein Isocyanat entsteht, konnte an einer bei 150°C sublimierten Substanzprobe im IR gezeigt werden. Das Sublimat lässt eine N=C=O-Bande bei 2270 cm^{-1} erkennen.

In Bezug auf eine zweite, ionische Zerfallsstufe (Molekülion des Isocyanat-Esters)wird in der Literatur (47) vermerkt, dass aliphatische Isocyanate das neutrale Bruchstück CH_2-N=C=O (FG = 56) und Ester die -OR-Gruppe abspalten (48).

2.Zerfall



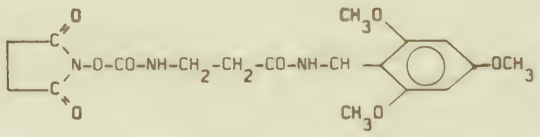
Der erste Weg ist nicht nachweisbar, denn ein Signal bei $\frac{m}{e}$ = 156 fehlt und das starke Signal bei $\frac{m}{e}$ = 56 will nichts besagen. Für einen Zerfall nach dem zweiten Weg spricht das Signal bei $\frac{m}{e}$ = 98 und ebenso der allerdings nur sehr schwache Peak bei $\frac{m}{e}$ = 114.

Spekulationen über die weiteren Zerfälle im MS sind ohne Vergleichsspektren einer Reihe ähnlicher Verbindungen nicht sinnvoll. Die obigen Beobachtungen und Ueberlegungen weisen mit einiger Wahrscheinlichkeit auf die Struktur 2, einen eindeutigen Beweis dafür liefert das MS jedoch nicht.

Misst man das Molekulargewicht der Verbindung osmometrisch in Wasser, so erhält man zeitlich sinkende Werte, was auf eine Reaktion mit dem LM schliessen lässt. Misst man in abs. THF, so erhält man als Mittel ein MG von 348 (Formelgewicht von 2 = 327).

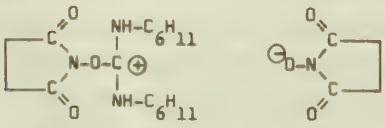
Weiter beobachtet man bei der dünnschichtchromatographischen Verfolgung der Reaktion (*), dass bei einem Ausgangsverhältnis zwischen HOSu und DCCI von 2:1 auch nach sehr langer Reaktionsdauer bei Rückflusstemperatur noch viel DCCI nachweisbar ist, während beim Verhältnis 3:1 das DCCI nach 48 h praktisch aufgebraucht ist, wobei gleichzeitig das Gewicht der auskristallisierten Produkte praktisch dem der eingesetzten Komponenten gleich ist. Damit wäre eine Stöchiometrie nach 3HOSu + 1DCCI ⟶ 2 + DCH angezeigt.

Schliesslich sei noch auf die Beobachtung von Weygand et al. hingewiesen (49), die bei der Kupplung von BOC-Glutaminsäure-α-benzylester mit dem sterisch gehinderten 2,4,6-Trimethoxy-benzylamin ein Nebenprodukt fanden,

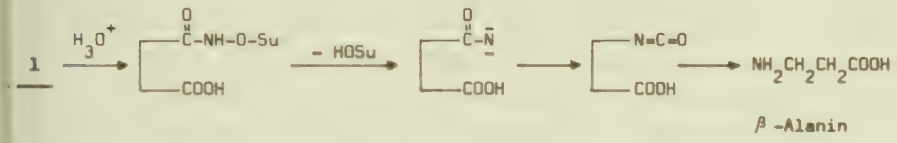


das auf ähnlichem Weg entstanden sein könnte, wie das Produkt aus DCCI und HOSu.

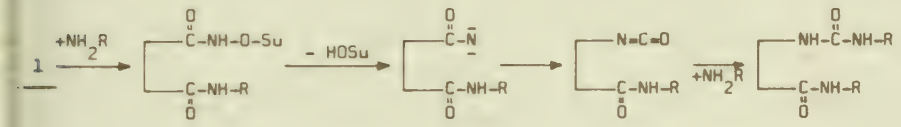
(*) Eine konduktometrische Verfolgung (vgl. Kap.113) der Reaktion lässt nach etwa einer Stunde ein deutliches Leitfähigkeitsmaximum erkennen. Dieses könnte (vgl.Kap.5.3) auf ein temporäres Zwischenprodukt vom folgenden Typ zurückzuführen sein:



Eine chemische Beweisführung von Gross, die auf der Beobachtung beruht, dass die saure Hydrolyse der Verbindung β-Alanin liefert, ist nicht eindeutig. Wohl würde Struktur 2 direkt β-Alanin abspalten, aber dieses könnte auch durch eine Lossen-Umlagerung aus 1 entstehen:



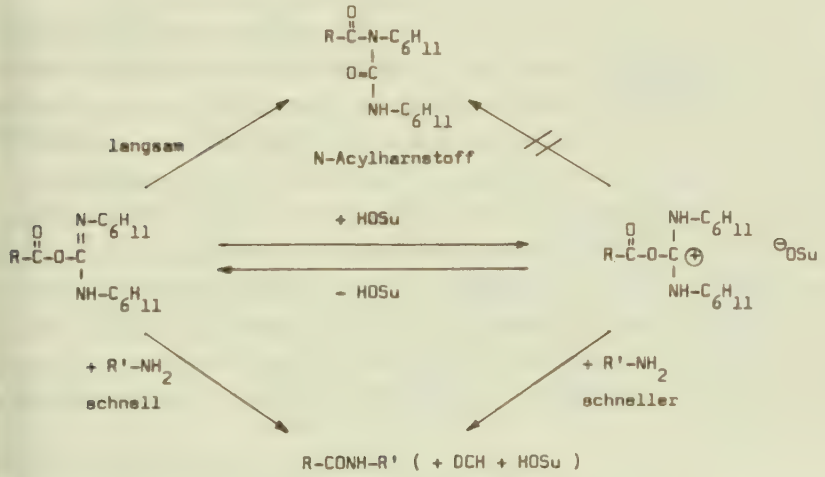
Entsprechendes gilt für den Umsatz mit Basen, den Gross als Beweis anführt:



Aus all diesen Gründen und trotz einiger bestehender Unklarheiten dürfte für das Reaktionsprodukt aus HOSu und DCCI die Struktur 2 (Succinimido-oxycarbonyl-β-alanin-hydroxysuccinimidester) richtig sein. Diese Verbindung kann, als aktivierte Säure, offensichtlich mit Basenkomponenten zu unerwünschten Nebenprodukten reagieren. Sie vermag aber, wie Versuche (vgl.Kap.13) gezeigt haben, nicht als Kupplungsreagenz zur Knüpfung einer Peptidbindung zu wirken. Für die günstige Wirkung des HOSu in der DCCI-Kupplung nach Wünsch kann sie also nicht verantwortlich gemacht werden, und es müssen dafür andere Mechanismen gesucht werden.

1. Hypothesen zum Reaktionsmechanismus.

Wünsch (33) ist in Uebereinstimmung mit Khorana (11) und Vo-
vinkel (5) ursprünglich vom Gedanken ausgegangen, dass HOSu wie
HN_3 die Reaktivität des primären Adduktes zwischen Säurekomponente
und DCCI (O-Acyl-Lactim) gegenüber Basen durch Protonierung ver-
stärken müssen; eine gleichzeitige Stabilisierung dieses Zwischen-
produktes durch Verminderung seiner Umlagerungstendenz zum N-Acyl-
harnstoff dürfte im Hinblick auf den im Reaktionsmilieu mit 1 - 2
Aequivalenten HOSu erreichbaren bescheidenen Protonierungsgrad
(vgl.Kap. 5.3.) kaum ins Gewicht fallen.



Der Rückgang an N-Acylharnstoff im Reaktionsprodukt wäre also
(vgl. Formelschema) weniger eine Folge der Protonierung des O-Acyl-
lactims, als vielmehr die Folge einer Verschiebung im Verhältnis
der Geschwindigkeiten von Aminolyse und intramolekularer Umlagerung.

Anderson und Zimmermann wiesen diese Erklärung zurück (30)
mit der Begründung, dass 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol,
8-Oxychinolin, p-Nitrophenol und Pivalinsäure - sämtlich Protonen-

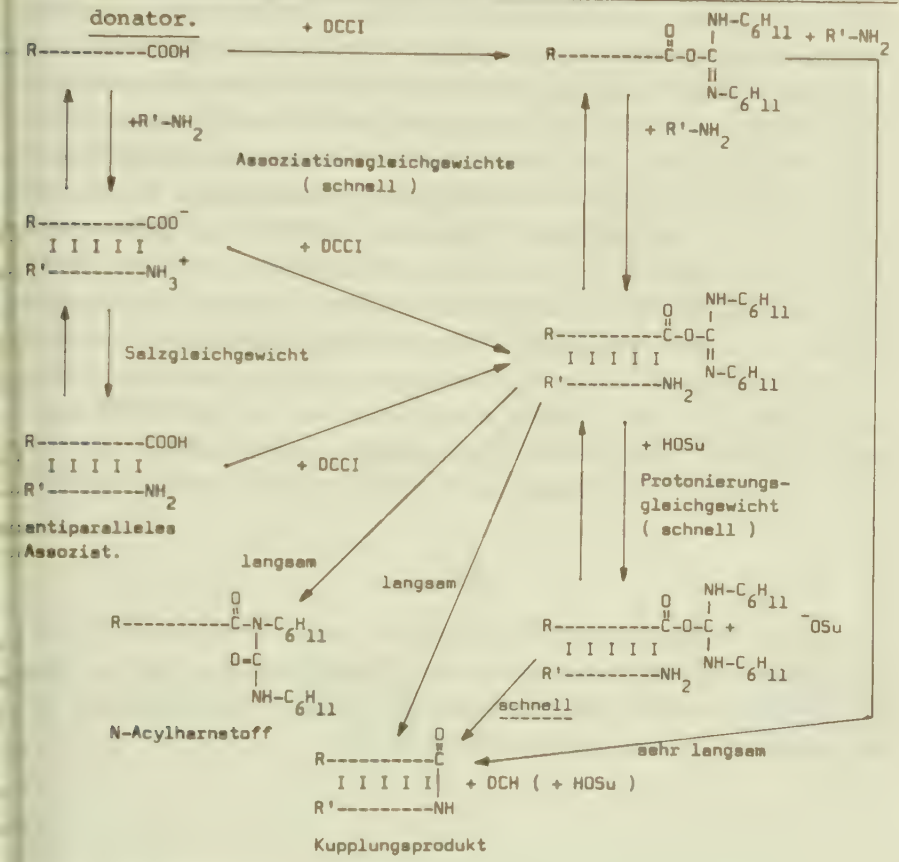
donatoren - ohne Wirkung seien, wobei als Kriterium allerdings nicht die N-Acylharnstoff-Bildung, sondern der Racemisierungsgrad verfolgt wurde. Der Unterschied fällt indessen kaum ins Gewicht, weil beide Effekte sowohl experimentell als auch theoretisch (*) parallel auftreten. Die genannten Autoren postulieren, wie auch Weygand, als Hauptmechanismus die Reaktion des O-Acyl-Lactims mit HOSu zum HOSu-Ester - de facto eine Darstellungsmethode für HOSu-Ester - und dessen Aminolyse zum Peptid R-CONHR'. In der Tat können die als Zwischenprodukte geforderten HOSu-Ester manchmal aus Wünsch-Kupplungen isoliert werden.

Wie dem auch sei, es fehlt eine Erklärung für die eigenartige und auffällige Beschränkung des HOSu-Effekts auf die DCCI-Kupplung von l a n g k e t t i g e n Kupplungskomponenten.

Die Anderson-Weygand'sche Interpretation ist neuerdings überhaupt fallenzulassen, denn die Wünsch-Reaktion verläuft in mindestens einem sichergestellten Fall eindeutig rascher als die Vergleichsreaktion zwischen vorgebildetem HOSu-Ester und der Aminkomponente (33). Der Gedankengang von Wünsch ist mindestens zu modifizieren. Eine erste Modifikation ginge dahin, ein Assoziat des O-Acyl-Lacims mit der Aminkomponente zu postulieren und gegebenenfalls die Idee von der Aktivierung durch Protonierung auf dieses Assoziat zu übertragen. Die Reaktionsbeschleunigung im Assoziat wäre also sterisch bedingt; durch Protonenkatalyse könnte sie noch weiter gesteigert werden. Man gelangt so zur nachstehenden Hypothese 1.

(*) Beide sind die Folge einer langen Lebensdauer des O-Acyl-Lactims bei langsam verlaufenden Kupplungen (25, 26).

.1. Hypothese 1. Antiparalleles Assoziat und HOSu als Protonendonator.



Alle Geschwindigkeitsangaben sind relativ.

LEGENDE (auch für die nachfolgenden Hypothesen gültig):

R-COOH oder R----------COOH Peptidsäure

R'-NH_2 oder R'---------NH_2 Peptidbase

R----------COOH
I I I I I
R'---------NH_2

bedeutet ein Assoziat aus Peptidsäure und Peptidbase mit Faltblatt-Struktur (pleated sheet, 66), wobei die salzbildenden Gruppen sich im Gleichgewicht befinden und, je nach Umständen, überwiegend in freier Form, geladener Form oder als Ionenpaar vorliegen. Eine parallele Faltblatt-Struktur würde diese "intramolekulare" Ionenpaarbildung ausschliessen.

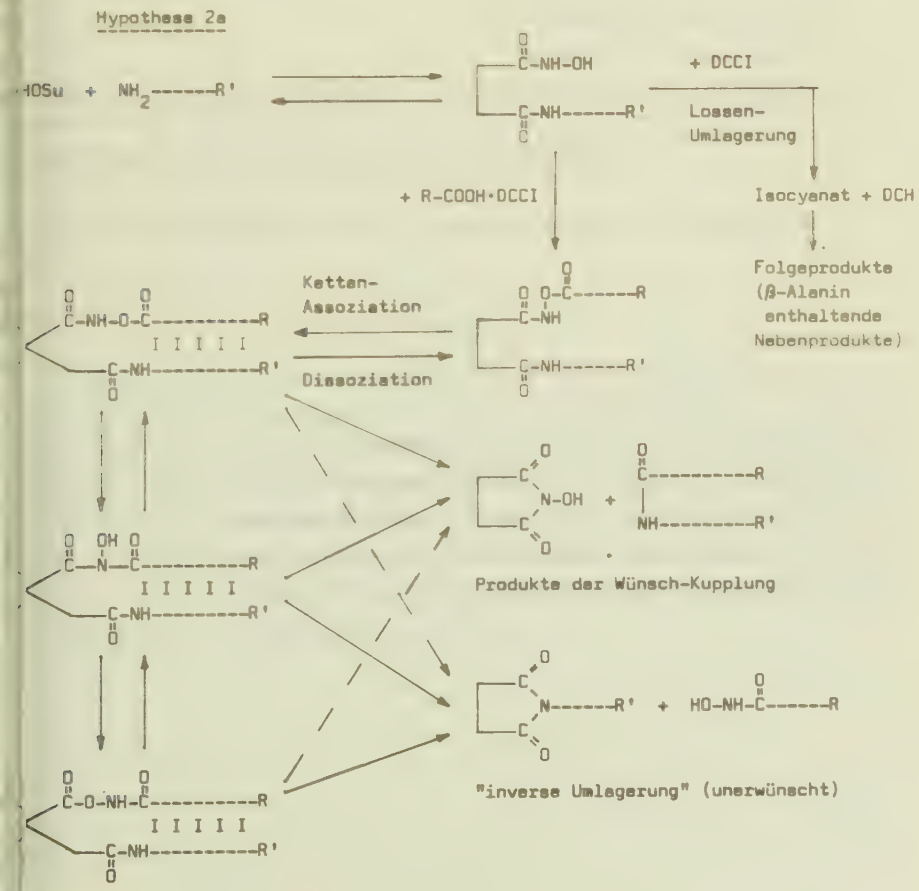
HOSu in zu hoher Konzentration (2 Aequivalente statt 1,oder noch mehr) würde durch partielle Protonierung der Peptidbase die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzen - eine Schlussfolgerung, welche experimentell bestätigt ist(Wünsch am 10. Europ. Peptid-Symp. Abano, 1969). Auch die Wirkung von HN_3 wäre deutbar, weniger aber die Wirkungslosigkeit der Verbindung N-Hydroxy-bis-acetimid und der andern von Anderson erprobten aziden Zusatzstoffe (vgl.Kap.3. Ein Abreagieren des Säure-DCCI-Adduktes mit HOSu zum HOSu-Ester und DCH, und nachfolgende Aminolyse des HOSu-Esters, wie es von Anderson, Weygand und anderen vermutet wird, ist aus dem vorstehen angeführten Grunde (zu geringe Reaktionsgeschwindigkeit) bei gros sen Komponenten höchstens als untergeordneter Seitenweg zu deuter Man beachte, dass die Bildung des HOSu-Esters in jedem Fall einer Umweg darstellt, und dass der HOSu-Ester einer Katalyse, wie sie die Protonierung des O-Acyl-Lactims darstellt, nicht zugänglich ist.

Einer weitergehenden Modifikation der ursprünglichen Vorstellungen entspräche ein chemisches Eingreifen von HOSu in eine oder mehrere Phasen der Umsetzung. Man gelangt in Verfolgung dies Möglichkeiten zu den Hypothesen 2a und 2b.

4.2. Hypothese 2a. Aminolyse von HOSu zur Hydroxamsäure und Anhydridbildung mit R-COOH·DCCI.

Als "aktiviertes Säureimid" - die OH-Gruppe mit ihrem negativen induktiven Effekt erhöht den nucleofugen Charakter des Imistickstoffs - bzw. inneres Anhydrid der Bernsteinmonohydroxamsäu

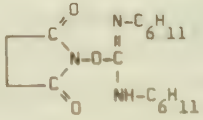
uss das HOSu einem nucleophilen Angriff durch die Aminkomponente ugänglich sein; dabei entsteht eine Hydroxamsäure. Diese dürfte inerseits, wie beispielsweise Benzhydroxamsäure (45, 51), mit CCI unter Lossen-Umlagerung zu DCH und einem Isocyanat reagieren wobei die Reaktionsbedingungen eine Rolle spielen) , andrerseits ber in Gegenwart des Peptidsäure-DCCI-Adduktes (O-Peptidyl-Lac-im) zur Bildung eines offenkettigen gemischten Hydroxam-Carbon-äure-anhydrides befähigt sein. Die Struktur eines solchen Anhy-rides bei Vorliegen von intramolekularer Assoziation der Peptid-este ist nun derart, dass eine Tendenz zu intramolekularer Umla-erung in HOSu und R-CONH-R' zu erwarten ist.



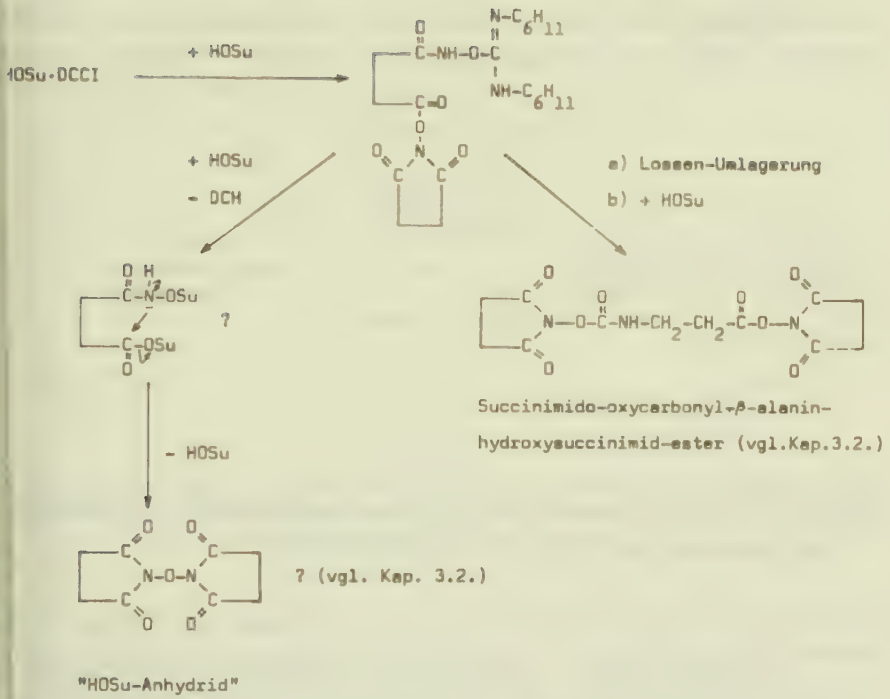
Dieses Schema bietet indessen keinen Platz für die Wirksamkeit von HN_3. Es kann natürlich trotzdem für HOSu und HOPhth gültig sein, denn für eine gleichartige Reaktionsweise der N-Hydroxyimide und von Stickstoffwasserstoffsäure liegt kein Beweis vor.

4 Hypothese 2b. Aminolyse eines HOSu-DCCI-Adduktes und N-O - Spaltung unter Bildung eines gem. Anhydrides.

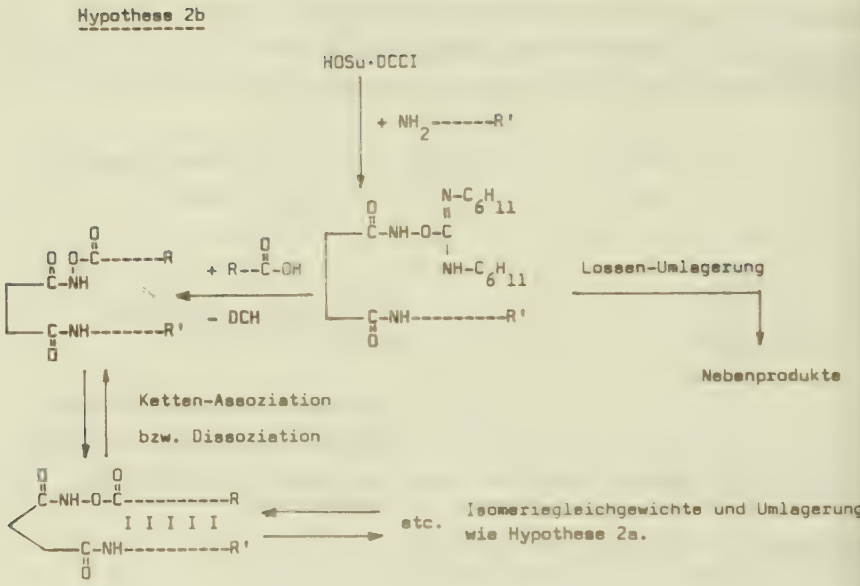
Die Tendenz zur Ringöffnung von HOSu wird bei dem DCCI-Addu



in verstärktem Mass zum Ausdruck kommen. In der Tat reagiert HOSu in Gegenwart von DCCI bei Abwesenheit anderer Nucleophile nachgewiesenermassen mit sich selber unter Bildung eines HOSu-Esters, der dann seinerseits in noch nicht völlig geklärter Weise in nicht völlig geklärte Folgeprodukte übergeht(vgl. Kap. 3.2.):



Während diese Reaktionsfolgen und ihre Produkte vermutlich eine Beziehung zum Ablauf der Wünsch-Kupplung aufweisen, kann die Ringöffnung statt durch HOSu natürlich wie nach Hypothese 2a auch durch die Aminkomponente bewirkt werden. Das primäre Reaktionsprodukt müsste dann aber unter N-O - Spaltung - ähnlich, wie bei der oben postulierten Bildungsweise des mehr oder weniger hypothetischen HOSu-Anhydrids - durch Reaktion mit der Peptidsäure in ein gemischtes Anhydrid übergehen können:



Die Hypothesen 1, 2a und 2b sind insofern konventionell, a die Reaktionsbeschleunigung im ersten Fall einer Kombination von Protonenkatalyse und Assoziation, in den Fällen 2a und 2b einer solchen von Umlagerungstendenz und Assoziation zugeschrieben wir Bei 2a und 2b geht die Erklärungsmöglichkeit für die Wirkung von HN_3 verloren, hingegen wäre die Unwirksamkeit von N-Hydroxy-bis-acetimid interpretierbar. Andrerseits ist bei 1 nicht zu verstehe warum andere Säuren nicht auch katalytisch wirksam sind.

Bei 2a bot die Aminolyse von HOSu den Ausgangspunkt zu ei Vorstellung, welche dem HOSu eine spezifische Rolle als vorüber-gehenden Träger von Basen- und Säurekomponente zuweist. Hypothes 2b mündet in dieselbe Konzeption ein. Nun ist ein Aufeinanderfol gen von kinetischen Einzelschritten, die keine Elementarprozesse im Sinne von Eigen (81) darstellen, mit ihrer Aufeinanderfolge vo diskreten Zwischenprodukten in der Regel nicht gerade geeignet, die Geschwindigkeit der Gesamtumsetzung zu erhöhen; die Wahrsche lichkeit ist gross, dass wenigstens e i n langsamer Schritt au tritt. Diese allgemeinen Bedenken gelten auch für 2a und 2b.

Dies führt zur Frage, ob die Adduktbildung von DCCI und HOSu nd die Komponentenassoziation nicht noch in einer andern als der isher betrachteten Weise reaktionsbeschleunigend wirken könnten, nd damit zur Hypothese 3.

..4. Hypothese 3. Konzertierte Reaktion eines Peptidkomponenten-Assoziats mit einem HOSu·DCCI-Addukt.

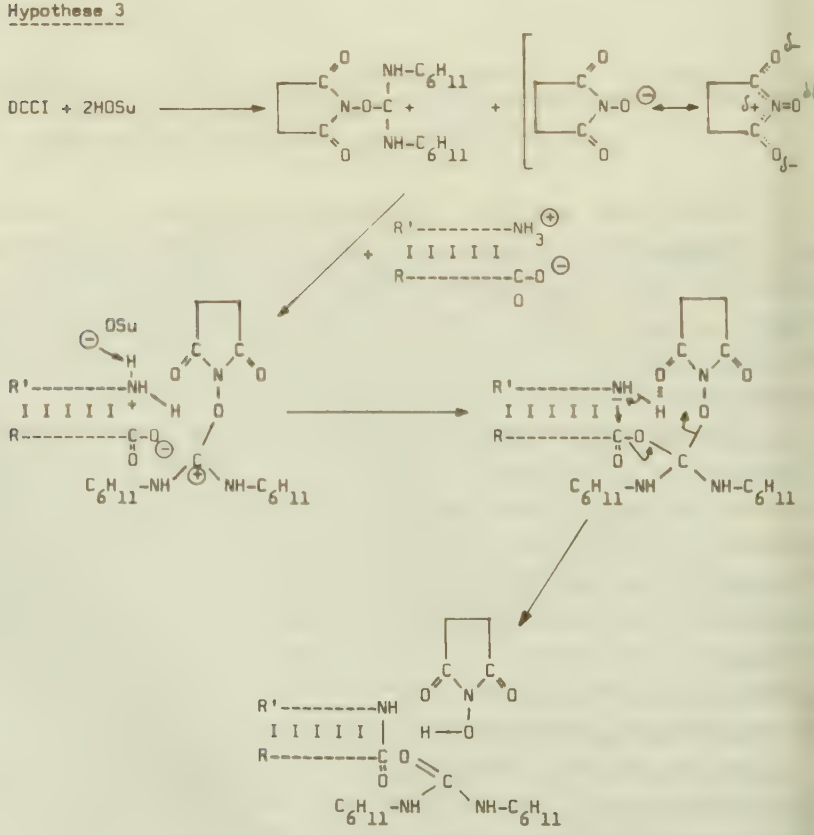
Beide eben genannten Prozesse (Adduktbildung und Assoziation) ind kinetisch voneinander unabhängig und schnell. Die Voraussetz-ngen für eine Folgereaktion zwischen ihren Produkten sind somit instig. Es ist denkbar, dass ein protoniertes HOSu·DCCI-Addukt eaktiv genug ist, um in einem primären Schritt mit der anionischen ruppe der assoziierten Säurekomponente zu reagieren.

Die postulierte primäre Reaktion beschränkt sich auf die Koor-ination eines anionischen Sauerstoffs mit einem kationischen Koh-enstoff und müsste dementsprechend relativ schnell verlaufen. Als eiter Reaktionsschritt kommt der aminolytische Angriff des Basen-ickstoffs auf das nunmehr Ester-artig aktivierte Carbonylkohlen-offatom der Säurekomponente in Betracht - ein Reaktionstypus, r Säure- oder Basen- bzw. bifunktionell katalysiert ist (22). Im chstehenden Reaktionsschema ist angedeutet, wie man sich die Rol-e von HOSu als bifunktionellen Katalysator denken könnte.

Aminolysegeschwindigkeiten sind wesentlich mitbestimmt durch .e Geschwindigkeit der Rückreaktion, durch welche das primäre Re-tionsprodukt wieder in seine Komponenten zerfällt (60). Die Sta-

bilisierung dieses primären Koordinationsproduktes durch rechtzeitige Protonenverschiebungen und die Begünstigung seines Zerfalls in Richtung auf das Endprodukt durch die Natur der Abgangsgruppe sind entscheidend für die Gesamtgeschwindigkeit der Aminolyse. Die Formelbilder 2 und 3 deuten an, dass die Verhältnisse in dieser Hinsicht durch eine Beteiligung von HOSu im Reaktionsknäuel günstig beeinflusst werden könnten. Es ist selbstverständlich, dass diese Formelbilder e i n S c h e m a ausdrücken und dass der Grundgedanke auch durch ähnliche Bilder zum Ausdruck gebracht werden kann.

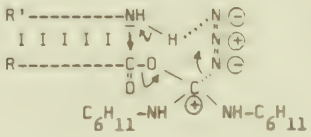
Hypothese 3



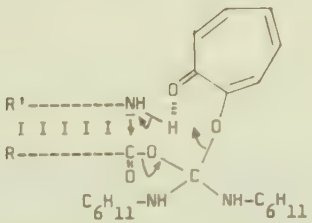
Die Reaktionsfolge ist dadurch gekennzeichnet, dass die Atome praktisch an ihren Plätzen bleiben und nur Elektronenverschiebungen stattfinden.

Offensichtlich ist diese Hypothese, im Gegensatz zu 2a und 2b am schwierigsten überprüfbar, denn die postulierten Zwischenprodukte sind kurzlebig und deshalb nicht präparativ fassbar.

Die Hypothese 3 vermöchte eventuell auch die Wirkung von N_3 zu erklären. Das Zwischenprodukt hätte etwa folgende Gestalt:



Verfolgt man die Hypothese weiter, so könnte man auf die Vermutung kommen, dass zur Erzielung der in Wünsch-Kupplungen beobachteten Effekte Zusätze mit einer Gruppierung vom Typ X-Y-Z mit einem durchgehenden π-System benötigt würden (HOSu: -CO-N-O-, N_3: $^{-}N=\overset{+}{N}=N^{-}$). Danach wäre zu prüfen, ob Tropolon nicht ebenfalls einen günstigen Effekt ergäbe. Der Zwischenzustand sähe etwa wie folgt aus:



Dieser Aspekt wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

. Experimentelle Ueberprüfung der Hypothesen.

Es stellt sich nun die Aufgabe, die vier Hypothesen anhand
on Versuchen zu stützen oder zu widerlegen. Dabei ist zu beach-
,en, dass ein Mechanismus durch Versuche nur widerlegt, nicht aber
:indeutig bewiesen werden kann.

Zunächst werden deshalb allgemeine Untersuchungen über die
:ssoziationsfähigkeit von Peptiden und die Aussagekraft von Iso-
:openversuchen behandelt - Versuche, die auf alle Hypothesen Be-
ıg nehmen. Danach werden spezifische Teilprobleme der Hypothesen
' (Protonierung von O-Acyl-Lactimen bzw. Isoharnstoffen, Kap.5.3.)
ıd insbesondere 2 (Untersuchung der Primärreaktionen, Kap. 5.4.
.d 5.5.) abgeklärt. Das Hauptgewicht wird dabei auf die Unter-
.chung der in den Hypothesen 2a und 2b enthaltenen intramolekula-
'n Umlagerung gelegt (Kap. 5.6.ff). Zur Hypothese 3 können bisher,
,t Ausnahme der Beobachtungen über die Protonierung von Isoharn-
offen (Kap. 5.3.) und der Möglichkeit einer Adduktbildung zwi-
,hen HOSu und DCCI (Kap. 5.5.), noch keine weiteren Aussagen ge-
cht werden.

1. Assoziationsuntersuchungen (Hypothesen 1 - 3)

In allen vier aufgestellten Hypothesen wird eine Assoziation
:: Peptidkomponenten angenommen. Zunächst soll also auf die Frage
:ngegangen werden, ob Assoziationen an Peptiden, die vom synthe-
:ischen Standpunkt wohl gross, vom biochemischen Standpunkt jedoch
:h sehr klein sind, überhaupt diskutiert werden dürfen.

Zur Verfügung standen einerseits ein thermoelektrisches Dampfdruckosmometer, d.h. ein Apparat zur Bestimmung der Teilchenzahl, und andrerseits ein Ostwald-Viskosimeter, d.h. ein Apparat zur Bestimmung der hydrodynamisch wirksamen Teilchengrösse.

An Peptiden aus der ACTH-Synthese (72) sollten durch osmometrische Molekulargewichtsbestimmungen Assoziationen untersucht werden. Es zeigte sich allerdings bald, dass mit den zur Verfügung stehenden Peptiden aus chemischen Gründen (Dissoziationseffekte, Reinheit), und bei der Messapparatur aus Empfindlichkeits- und Stabilitätsgründen oft nur unzuverlässige oder nicht interpretierbare Resultate zu erhalten sind.

Mit Hilfe von thermoelektrischen Dampfdruckosmometern (Methode der isothermen Destillation, 35, 36) sind schon früher Assoziationen an Peptiden (37), Farbstoffen (38) und Seifen (40) bestimmt worden. Es wurde andrerseits unterdessen berichtet, dass bei der MG-Bestimmung von Peptiden allein schon durch die Anwesenheit freier Carboxylgruppen Ungenauigkeiten auftreten können. Einige eigene Resultate sollen diese Aussagen verdeutlichen.

Zunächst wurden Messungen am Tetracosapeptid H-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro-OtBu·3HCl·$\cdot 6H_2O$ (im folgenden H-ACTH-11-24-OtBu genannt) vorgenommen. Als erstes interessierte eine Bestimmung des Teilchen-Gewichts, als zweites der Einfluss von Harnstoff auf diese Bestimmung. Man konnte erwarten, dass der Harnstoff eine allfällige Assoziation des Peptids abschwächen würde. Das Formelgewicht des eingesetzten Peptids beträgt 2226. Messungen des Molekulargewichts ergaben:

H-ACTH-11-24-OtBu Formelgewicht FG=2226

		Osmometrische Bestimmungen: MG	Kryoskopische Nachprüfung der wässrigen Lösungen: MG
ei 45° in MeOH		770	
ei 60° in H_2O	Lösung 1	870	590
" "	" 2	1085 (!)	700
" "	" 3	735	695
" "	" 4*	840	

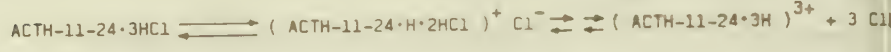
Messung in 1n-Harnstofflösung.
.e mit 1, 2 und 3 bezeichneten Lösungen repräsentieren
weils neue Einwaagen und Messreihen (vgl. Kap. 12.1.).

Man entnimmt diesen Resultaten eine enttäuschend grosse reuung der osmometrischen Messungen. Im einzelnen können für die solute und relative Abweichung der Resultate vom Formelgewicht lgende Punkte angeführt werden:

- Für Messungen in Methanol und vor allem in Wasser findet n aus physikalischen Gründen eine bedeutend geringere Empfindchkeit (Messausschlag bezogen auf eine bestimmte molare Konzenation) gegenüber solchen in unpolaren Lösungsmitteln wie Chlorom, THF, Benzol etc.. Das Empfindlichkeitsverhältnis beim Uebergng von THF zu H_2O beträgt beispielsweise etwa 6 : 1 .
- In der Praxis findet man, dass sich die Nullpunktsstabiität des Messgerätes mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels schlechtert. Dies hat mit Punkt 1 zusammen zur Folge, dass bei ssungen in polaren Lösungsmitteln das Signal-Stör-Verhältnis bei tleren und kleinen Konzentrationen sehr ungünstig wird. Grösse Peptide, insbesondere die verwendeten, sind aber in apolaren ungsmitteln gar nicht, in polaren nur wenig löslich.
- Da die Osmometrie auf die Anzahl gelöster Teilchen pro umeneinheit anspricht, erkennt man sofort, dass Interpretationswierigkeiten auftreten, sobald eine Partikel an Dissoziationslichgewichten teilnimmt (zB. Carboxylgruppen, 39). Treten dazu h Verunreinigungen von wesentlich anderem (hier meist kleinerem)

Molekulargewicht, so werden die Resultate vollständig verfälscht, und Assoziationen sind, wenn gleichzeitig alle erwähnten Schwierigkeiten auftreten, bestenfalls qualitativ feststellbar.

Der um einen Faktor 3 zu kleine Messwert aus obigem Beispiel könnte auf eine Dissoziation in Wasser



zurückzuführen sein. Diese sollte dann aber in Methanol zurückgedrängt werden. Andrerseits kann sich im Methanol das Kristallwasser, sofern es nicht im Peptid assoziiert bleibt, auf die Messung auswirken und ein zu kleines Molekulargewicht vortäuschen.

Die starke Streuung der Messwerte muss unter diesen ungünstigen Betriebsbedingungen hauptsächlich den im zweiten Punkt erwähnten apparativen Störungen angerechnet werden.

Einen beträchtlichen Einfluss haben aber auch die Beimengungen im Peptid; ihre Gegenwart steht ausser Frage (DC). Es sei auch auf die folgenden beiden Beispiele verwiesen:

Das Hexapeptid Z-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-OMe (Z-ACTH-11-16-OMe) mit dem Formelgewicht 1104 besitzt keine dissoziierbaren Gruppen. Man erwartete deshalb einen ungefähr richtigen oder - im Falle von Assoziationen - einen zu grossen Wert für das Molekulargewicht. Folgende Werte wurden gefunden:

Osmometrische Messungen.

			MG
Z-ACTH-11-16-OMe (FG=1104)	bei 90°C in DMF:	Lösung 1	915
	" "	" 2	895
	bei 90°C in DMF*:	" 3	875
	" "	" 4**	896
	" "	" 5***	905

* DMF nach Wünsch gereinigt (71).

** Peptid 24 h am HV getrocknet.

*** Peptid über Kieselgelsäule gereinigt und am HV getrock

Die durchschnittliche Absenkung von etwa 20% bestätigt die Anwesenheit n i e d e r m o l e k u l a r e r Verunreinigungen. Diese sind bekanntlich durch einfache Reinigungsoperationen oft nicht entfernbar.

Noch drastischer war die Abweichung bei Z-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg(NO_2)-Try-Gly-OMe (Z-ACTH-5-7(NO_2)-10-OMe), das bei einem Formelgewicht von 1035 ein gemessenes Molekulargewicht von 630 ergab.

Ein Hinweis auf die Existenz von Assoziationen konnte immerhin an zwei Beispielen gefunden werden:

1. Das Formelgewicht von Z-Phe-Arg Try-Gly-OH (Z-ACTH-7-10-OH) beträgt 717. Hier ergab nun die osmometrische Messung in DMF ein praktisch übereinstimmendes Molekulargewicht von 724. Mit dem Osmometer wurde nun eine Messreihe an Z-ACTH-7-10-OH bzw. Methionin-isopropylester (H-Met-OiProp) bzw. HOSu (entsprechend den Komponenten einer Wünsch-Kupplung vor Zugabe von DCCI) aufgenommen, wobei als Lösungsmittel neben DMF auch Lösungen dieser Komponenten (einzeln und in Zweierkombination) in DMF verwendet wurden. Bezugsflüssigkeit war dementsprechend DMF oder ein Lösungsmittel laut nachstehender Tabelle; die Apparatur wurde derart jeweils auf Null abgeglichen. Diese differentielle Messanordnung lässt sich in der Osmometrie bei Beachtung einiger Vorschriften (vgl.Kap.12.3.) besonders gut verwirklichen. Die Methode gestattet es, jede der Komponenten im Milieu einer oder zweier anderer zu untersuchen. Eine Abnahme der Teilchenzahl in der Lösung, zB. infolge Assoziation, drückt sich dann in einer scheinbaren Erhöhung des Molekulargewichts aus.

Osmometrische Messungen bei 90° am System Z-ACTH-7-10-OH / H-Met-OiPr / HOSu / DMF im Aequivalenzverhältnis 1 : 1 : 2 : 310 .

Lösungsmittel:	DMF*	HOSu-DMF		MiP-DMF		ACTH-DMF	
Verbindung: FG	MG	MG*	MG*/FG	MG*	MG*/FG	MG*	MG*/FG
HOSu 115	111	-	-	140	1,22	120	1,04
H-Met-OiPr 191	192	221	1,16	-	-	201	1,06
Z-ACTH-7-10-OH 716	724	1020	1,43	778	1,09	-	-

Lösungsmittel:	HOSu-MiP-DMF		HOSu-ACTH-DMF		MiP-ACTH-DMF	
Verbindung:	MG*	MG*/FG	MG*	MG*/FG	MG*	MG*/FG
HOSu	-	-	-	-	123	1,07
H-Met-OiPr	-	-	220	1,15	-	-
Z-ACTH-7-10-OH	850	1,19	-	-	-	-

Es bedeuten:

FG	Formelgewicht
MG*	scheinbares Molekulargewicht
DMF*	DMF, gereinigt nach Wünsch (71)
HOSu-DMF	Lösung von HOSu in DMF*
MiP-DMF	" " H-Met-OiPr in DMF*
ACTH-DMF	" " Z-ACTH-7-10-OH in DMF*
HOSu-MiP-DMF	" " HOSu + H-Met-OiPr in DMF*
HOSu-ACTH-DMF	" " HOSu + Z-ACTH-7-10-OH in DMF*
MiP-ACTH-DMF	" " H-Met-OiPr + Z-ACTH-7-10-OH in DMF*

Man erkennt sofort (Kolonne HOSu-DMF), dass HOSu eine starke
irkung auf das Tetrapeptid ausübt, die als Assoziation gedeutet
erden kann. Der stärkste Effekt ergibt sich bei Gegenwart von
)Su allein (scheinbares MG von 1020); der Rückgang bei zusätzli-
ner Anwesenheit der Basenkomponente (Kolonne HOSu-MiP-DMF) kann
mit zusammenhängen, dass im zweiten Fall Salzgleichgewichte spie-
n, wobei aus dem HOSu (pK 5,9) teilweise das Anion entsteht, wel-
es andere Wechselwirkungen mit dem Peptid eingehen könnte als das
geladene Molekül. Es ist also möglich, dass entweder HOSu die
soziation von Peptiden fördert, oder dass es selbst mit ihnen
soziiert.

Der umgekehrte Versuch, die Messung des MG von HOSu in ACTH-
sung, ergibt zahlenmässig einen geringeren Effekt. Dies ist eine
lge davon, dass die Messreihe, entsprechend dem Wünsch-Ansatz,
weils auf 2 Aequivalenten HOSu und nur je einem Aequivalent der
dern Komponenten basiert. Deshalb sind Versuche an identischen
nischen nicht symmetrisch, wenn die Bezugsflüssigkeit gewechselt
rd.

Weiter ist zu beachten, dass keine dieser Messungen Auskunft
über gibt, ob die Assoziation zwischen den Peptidmolekülen al-
n oder zwischen Peptid und HOSu erfolgt, da die Anzeige nur ein
s für die A n z a h l gelöster, freier Teilchen ist.

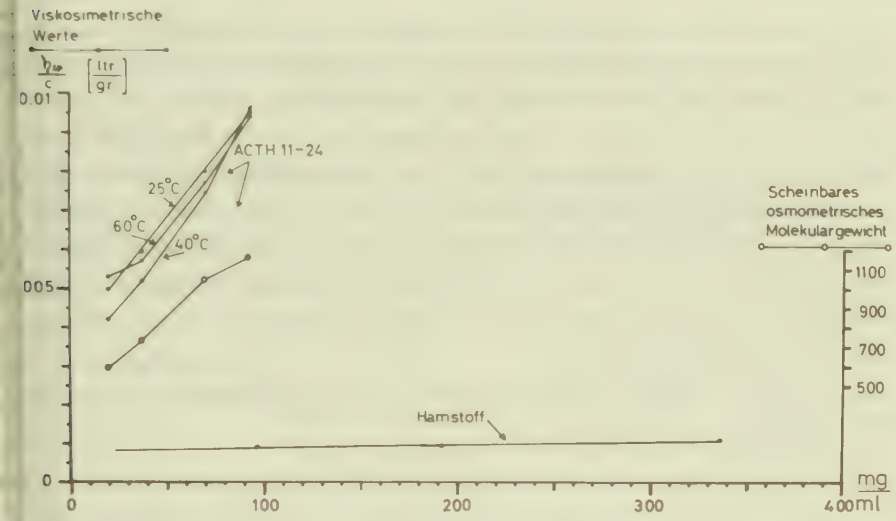
Die beobachtete Wechselwirkung von HOSu oder vom Peptid mit
Basenkomponente (pK 7,1) kann auch als Bildung eines nicht voll
soziierten Salzes interpretiert werden.

Interessant ist , dass die "Assoziation" des Peptids in Ge-
wart von HOSu mit einer Löslichkeitserhöhung (vgl.Kap.3.1.) ein-
geht; im Lichte moderner Theorien (77, 78, 79) über Ursachen von
formationswechseln und Assoziationen (Tertiär- und Quartärstruk-
) von biologischen Makromolekülen würde man folgern, dass die
r beobachtete Assoziation eine Maskierung von löslichkeitser-
werenden Atomgruppen im Peptid bewirkt.

2. Viskosimetrische Messungen wurden bisher hauptsächlich zur Charakterisierung niedermolekularer mizellbildender und hochmolekularer Stoffe (zB. MG 10'000) herangezogen (41,42,43,80). Die Viskosität wird beeinflusst durch das Molekulargewicht, die Gestalt, die Solvatisierung und die Assoziation der gelösten Partikel bzw. durch die Konzentration, die Temperatur und die Strömungsgeschwindigkeit einer Lösung. Je nach Problemstellung müssen also in einer Messreihe gewisse dieser Parameter konstant gehalten werden. In der Praxis hat der Wert $\frac{\eta_{sp}}{c}$ (vgl. Kap. 12.2.), im englischen Sprachgebrauch als "intrinsic viscosity", im deutschen ua. auch als"innere Viskosität"bezeichnet, eine besonder Bedeutung zur Beantwortung von Fragen über das Molekulargewicht, die Gestalt und die Assoziationen (Mizellen) einer Partikel in Lösung. Findet man bei Hochmolekularen beispielsweise eine geringe Abhängigkeit der "inneren Viskosität" von der Konzentration (sowie der Aggregatgrösse und des Polymerisationsgrades), so liegen kugelförmige Teilchen vor; eine starke Abhängigkeit der "inneren Viskosität" von der Konzentration weist dagegen auf gestreckte Teilchen hin, welche sich bei Verringerung des gegenseitigen Abstandes zunehmend stören (44).

Die relativ hohe Viskosität von Natrium-Oleat-Lösungen in Wasser hängt mit der langgestreckten Form der Mizellen zusammen; mit Erhöhung der Konzentration ergibt sich eine Vergrösserung der Mizelle. Bei grösseren Konzentrationen zeigt die Viskosität eine starke Temperaturabhängigkeit, durch Erhöhen der Temperatur werden die Mizellen zerstört. Aus Messungen der Temperaturabhängigkeit der Viskositätszahlen ergibt sich also die Möglichkeit, Mizellkolloide und Molekülkolloide zu unterscheiden. Linare Makromoleküle in Lösung zeigen einen Temperaturkoeffizienten der Viskositätszahlen zwischen 60° und 20° von 0,85 - 1,00. Werden niedrigere Werte gefunden, so liegen entweder Mizellen oder bei Lösungen identifizierter Makromoleküle makromolekulare Assoziationen vor, wie sie zB. bei Lösungen von Polyvinylchlorid in Methyläthylketon festgestellt wurden. Die Temperaturabhängigkeit gibt also den wichtigen und experimentell leicht bestimmbaren Hinweis auf das Vorliegen von molekularen Lösungen.(44).

Vom schon erwähnten H-ACTH-11-24-OtBu·3HCl·6H_2O wurde die „innere Viskosität" in Abhängigkeit der Konzentration und der Temperatur in wässriger Lösung bestimmt und mit derjenigen von Harnstoff in Wasser (typisches niedermolekulares Beispiel) verglichen:



Die "innere Viskosität" der Peptidlösungen als Funktion zunehmender Konzentration zeigt einen bedeutend stärkeren Anstieg als die der Harnstofflösungen. Das Peptid mit seinem - im Vergleich zu den eigentlichen Makromolekülen - kleinen Formelgewicht von 2226 zeigt demnach schon ein Verhalten, das jenem von gestreckten Makromolekülen bzw. Mizellen entspricht. Diese Feststellung muss als Ausdruck intermolekularer Assoziationen interpretiert werden. Die Dissoziate würden also Makromoleküle (Mizellen) vortäuschen.

Die experimentell gefundene geringe Abhängigkeit der "inneren Viskosität" von der Temperatur im Intervall 25 - 60° ist im Sinne von Batzer (44) nur deutbar, wenn das Mizellgleichgewicht im vorliegenden Fall weniger temperaturabhängig ist als bei Natriumdodecat-Lösungen, eine Hypothese, die durchaus plausibel erscheint.

Unterstützt werden diese Resultate durch die parallel an den identischen Lösungen durchgeführten osmometrischen Messungen; man erkennt eine Zunahme des scheinbaren Molekulargewichts mit der

Konzentration, wobei allerdings die Absolutwerte aus den weiter oben besprochenen Gründen bedeutend zu tief sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich Assoziationen im thermoelektrischen Dampfdruckosmometer unter günstigen Voraussetzungen (Chemismus und Reinheit der Ausgangsmaterialien, Messbedingungen) beobachten lassen. Der Aussagewert dieser Messungen ist aber limitiert, einerseits durch die besprochenen und eventuell weiteren Störfaktoren, andrerseits dadurch, dass keine Angaben über den "Mechanismus" der Assoziationen (Assoziations-Partner und sterische Anordnung) möglich sind. Immerhin zeigen die Versuchsresultate, dass schon bei kleineren Peptiden Assoziationseffekte auftreten können.

Unter diesem Gesichtspunkt sind die Hypothesen 1 - 3 also zuzulassen.

5.2. Isotopenmethode.

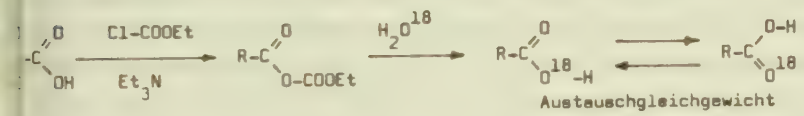
Allen hypothetischen Mechanismen gemeinsam ist die Entstehung von DCH aus DCCI. Das dabei übertragene Sauerstoffatom kann nur aus den Hydroxylgruppen des HOSu oder der Peptidsäure stammen. Nach den Untersuchungen von Vowinkel(52) über die Bildu von Anisol aus Phenol, Methanol und DCCI gelangt der Sauerstoff jener Verbindung, die zuerst an das DCCI addiert wird, in den DC

Man könnte sich deshalb fragen, ob eine O^{18}-Markierung von

OSu oder der Peptidsäure, verbunden mit einer massenspektrometischen Untersuchung des aus einer damit erfolgten Wünsch-Kupplung esultierenden DCH, Auskunft über den Mechanismus zu erteilen veröchte.

Der Versuch wurde aus folgenden Gründen nicht durchgeführt:

- Die Markierung des HOSu kann auf den herkömmlichen Synesewegen(53) nicht erfolgen, da dies einen viel zu hohen H_2O^{18}-edarf erforderte. Vorversuche, das für die Untersuchung vorgeehene BOC-ACTH-1-10-OH·HCl selektiv am Carboxylende zu aktivieren, oten ebenfalls Schwierigkeiten. Es war geplant, entsprechend der upplungsmethode der gemischten Anhydride, die Peptidsäure mit lorameisensäure-äthylester zu aktivieren und anschliessend sort wieder mit H_2O^{18} zu hydrolysieren:



Diese Reaktionsfolge, vorerst mit gewöhnlichem Wasser und ter verschiedenen Bedingungen ausgeführt, ergab in der dünnhichtchromatographischen Untersuchung eindeutig eine vom Ausngsprodukt verschiedene Verbindung (bis zu 90%). Diese lässt ch durch eine 10-prozentige Sodalösung langsam (120 h, 20°) wier in die Peptidsäure (DC) zurückführen. Diese relativ scharfe ssnahme deutet jedoch darauf hin, dass hier das Produkt einer erwünschten Nebenreaktion vorliegt. Es ist deshalb sehr fragch, ob auf diesem Wege eine sichere Markierung dieser Säure erhaupt gelingt.

- Die Markierung müsste in jedem Fall mit einem hochprotig angereicherten schweren Wasser ausgeführt werden, da infolder Verluste während der Markierung, ihrer durch das Austauschgleichgewicht bedingten Halbierung und weiterer Verluste während Probekupplung und der Isolierung des DCH sonst kein sicheres sergebnis mehr zu erwarten wäre.

- In den meisten besprochenen Hypothesen muss angenommen den, dass der DCH-Sauerstoff aus der Peptidsäure stammt, näm-

lich immer dann, wenn diese zuerst mit dem DCCI reagiert. Dies be trifft die Hypothesen 1, 2a und eventuell 3. Zu unterscheiden da- von wäre die Hypothese 2b. - Nun ist aber noch zu bedenken, dass in jedem Fall mit Nebenreaktionen, wie sie zB. im Kapitel 3.2. be schrieben wurden, zu rechnen ist. Damit unter diesen Umständen eine verlässliche Interpretation des Versuchs möglich wäre, müsst der Sauerstoff also praktisch zu 100% aus der Peptidsäure oder de HOSu stammen. Dies ist aber bei der Vielfalt der schon bekannten möglichen Reaktionen (vgl. Kap. 2. und 3.2.) unwahrscheinlich.

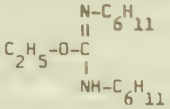
- Das aus einem solchen Isotopenversuch zu erwartende Re sultat wurde aus diesen Gründen bisher als zu gering und zu un- sicher betrachtet, wenn man es in Relation zu den noch nötigen A klärungen und zum finanziellen Aufwand setzt. - Jedenfalls sollt für einen solchen Versuch ein grosses Peptid zur Verfügung stehe das keine unübersichtlichen Nebenreaktionen eingehen kann, mit d aber ebenso gute Erfahrungen bei Kupplungen nach der Wünsch-Metho gemacht worden wären.

5.3. Zur Protonierung von O-Acyl-Lactimen bzw. Isoharnstoffen durch HOSu (zu den Hypothesen 1 und 3)

Die Hypothesen 1 und 3 beinhalten eine Protonierung des O-Acyl-Lactims durch die schwache Säure HOSu (pK 5,9). O-Acyl-Lactime konnten bisher noch nie als Zwischenprodukte isoliert werden.

Eigene Leitfähigkeitsversuche mit (vgl.Kap. 11.2.)dem

owinkel'schen Isoharnstoff-Zwischenprodukt (31, 32)



efern in der Tat einen Hinweis darauf, dass eine Salzbildung lgender Art durchaus möglich ist:

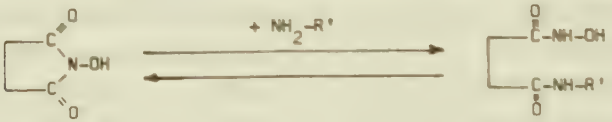
rsetzt man nämlich den Isoharnstoff unter konduktometrischer ntrolle mit HOSu in THF, so nimmt dabei die Leitfähigkeit der sung langsam zu. Bei 4 - 5 Aequivalenten erreicht sie einen konant bleibenden Maximalwert und ist dann etwa 90 mal grösser als ne einer Vergleichslösung mit HOSu. Dies ist wohl nur durch eine lzbildung erklärbar. Die teilweise Protonierung eines O-Acyl-ctims nach Wünsch (24) ist also nicht ausgeschlossen (*). Ob sie e N-Acylharnstoff-Bildung direkt verhindert, lediglich die Amilyse des O-Acyl-Lactims beschleunigt (Hypothese 1) oder in einer nzertierten Reaktion im Sinne der Hypothese 3 eine Rolle spielt, eibt offen.

Es sei auch auf die temporäre Erhöhung der Leitfähigkeit rend der Reaktion zwischen HOSu und DCCI (Kap. 3.2.) hingesen.

5.4. Die Ringöffnung von HOSu durch Nucleophile. (zu Hypoth. 2a)

Die Hypothese 2a geht von einem nucleophilen Angriff der Peptidbase auf das HOSu aus. Die folgenden Beobachtungen zeigen, dass eine solche Primärreaktion grundsätzlich nicht von der Hand zu weisen ist.

Löst man HOSu und eine primäre Base, zB. NH_2-Val-OMe, in Dioxan und fügt einen Tropfen Eisentrichlorid-Lösung hinzu, so wird die Lösung nach einigen Sekunden bräunlich, nach einigen Minuten allmählich rotviolett verfärbt. Die Farbe bleibt auf Säurezusatz bestehen. HOSu allein ergibt eine entsprechende Färbung erst nach 2 Stunden (infolge Ringöffnung durch die Salzsäure) und die Base allein gar keine. - Man kann daraus schliessen, dass eine Base den HOSu-Ring öffnet und eine Bernstein-4-amid-1-hydroxamsäure bildet:



Eine genauere Untersuchung der Reaktion ergibt, dass ein Gleichgewicht vorliegt. In einer Lösung von je einem Aequivalent HOSu und Benzylamin in THF lässt sich nach einer Reaktionszeit von 75 Minuten bei 20° im DC eine Hydroxamsäure mit gleichem R_f-Wert wie ein Referenzpräparat (vgl. Kap. 14.) nachweisen. Ihre Isolierung für die nachfolgende Identifizierung durch IR, Smp. und Hydroxamsäuretest gelingt durch fraktionierte Kristallisation. Diese Hydroxamsäure ist, wie noch später berichtet wird, eine auf den ersten Blick stabile Verbindung. Lässt man sie bei 20° aber in Methanol gelöst stehen, so kann man im DC nach etwa einem Monat wieder HOSu und Benzylamin nachweisen. Es liegt also ein Gleichgewicht vor.

Dasselbe gilt auch für HOPhth, nur dass dort das Gleichgewicht aus sterischen Gründen mehr auf der ringgeschlossenen Seite liegt und sich rascher einstellt.

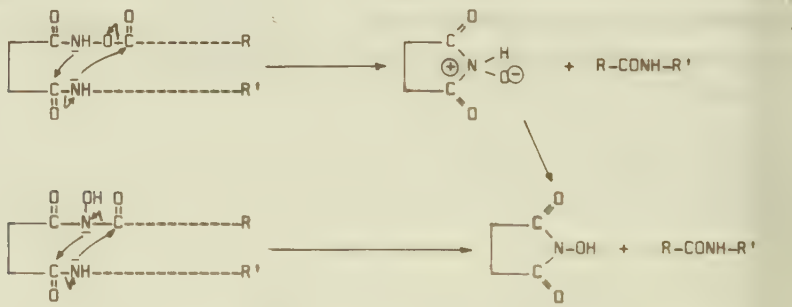
Die Primärreaktion der Hypothese 2a ist somit nicht auszuschliessen.

5. Die Adduktbildung von HOSu und DCCI. (zu Hypothesen 2b und 3)

Dass HOSu und DCCI miteinander eine Reaktion eingehen wurde
hon im Kapitel 3.2. eingehend behandelt. Als erster Schritt muss
nl eine Adduktbildung zwischen HOSu und DCCI angenommen werden.
welcher Weise dieses Zwischenprodukt dann weiterreagiert hängt
n den Geschwindigkeiten der Folgereaktionen ab: eine Lossen-Um-
gerung führt zu Nebenprodukten, der Angriff durch eine Basen-
mponente zur Hypothese 2b und die konzertierte Reaktion mit
nem Peptidkomponenten-Assoziat zur Hypothese 3.

5.6. Die Umlagerungsfähigkeit von Modellverbindungen, die den Zwischenprodukten der Hypothesen 2a und 2b entsprechen.

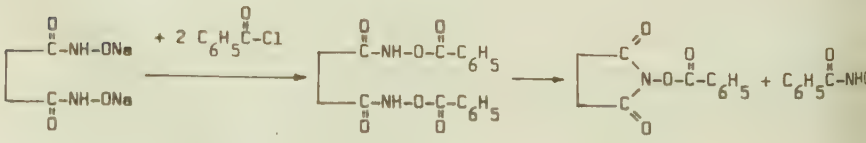
Ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung der vorgeschlagenen Mechanismen der Wünsch-Reaktion ist die in den Hypothesen 2a und 2b nötige gleichzeitige Umlagerung und Eliminierung. Sie wird im Folgenden nur als Umlagerung bezeichnet.



Von dieser Umlagerung muss verlangt werden, dass sie, unter Berücksichtigung aller Gegebenheiten (sterische Faktoren, Assoziation), unter den üblichen Reaktionsbedingungen (zB. 0 - 20°) spontan abläuft, sonst kann ein derartiger Mechanismus für die Wünsch-Reaktion nicht in Frage kommen.

Eine solche Umlagerung scheint noch nicht beschrieben worden zu sein, doch findet man in der Literatur einige Hinweise, die sie als möglich erscheinen lassen:

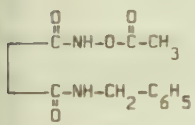
Hurd und Botteron berichten von einer Eliminierung, die über eine O-acylierte Bernstein-dihydroxamsäure verläuft (54):



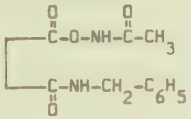
Ebenfalls eine gewisse Aehnlichkeit weist die von Sammes be-
bachtete Aminoacyleinlagerung auf (55). Als Nucleophil auf die
ktivierte O-Acyl-Gruppe genügt hier offenbar ein primärer Amid-
tickstoff:

Diese Versuche, wie auch jene von Rajappa (16, 17) und Pless
6) weisen auf die acylierenden Eigenschaften von O-acylierten
droxamsäuren, die man sinngemäss als gemischte Anhydride aus
ner Carbon- und einer Hydroxamsäure ansehen kann, hin.

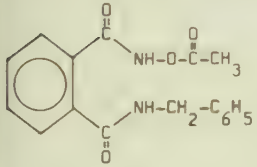
Für die zu synthetisierenden Modellzwischenprodukte (ZP) wur-
in dieser Arbeit folgende Varianten gewählt:



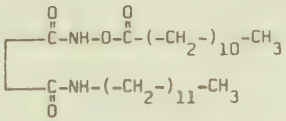
ZP 1



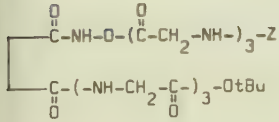
ZP 2



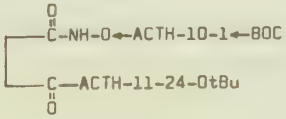
ZP 3



ZP 4



ZP 5



ZP 6

Es sei hier vorweggenommen, dass die postulierte Umlagerung tatsächlich nachgewiesen werden kann, jedoch zum Teil erst bei hohen Temperaturen.

Die Beispiele 1 und 2 wurden als erste Modelle zur Abklärung von Synthese und Analyse ausgeführt. ZP 1 entspricht dem hypothetischen Zwischenprodukt einer Wünsch-Kupplung von Essigsäure und Benzylamin. ZP 2 ist zu ZP 1 isomer; es ist invers bezüglich diesem acyliert und wurde zunächst als Strukturbeweis für ZP 1 benützt. Es erleidet aber selbst ebenfalls eine thermische Umlagerung.

Beispiel 3, ein hypothetisches ZP einer Wünsch-Kupplung mit HOPhth als Zusatz, ergab aus sterischen Gründen eine beschleunigte Umlagerung verglichen mit den übrigen Modellen.

Beispiel 4 wurde zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses der lipophilen Wechselwirkung von langen aliphatischen Substituenten gewählt.

Beispiel 5 entspräche dem ZP aus einer Kupplung von Z-$(Gly)_3$-OH mit H-$(Gly)_3$-OtBu, ist bei 20° aber eine praktisch stabile Verbindung.

Ob Beispiel 6 überhaupt dargestellt wurde lässt sich aus noch zu erörternden Gründen (Kap. 7.7.) nicht sicher sagen. Jedenfalls ist es in keinem Versuch gelungen Umlagerungsprodukte nachzuweisen (vgl. Kap. 5.6.5. und 7.7.).

Bemerkungen und Beobachtungen zur Synthese dieser Modellverbindungen werden im Kapitel 7. behandelt.

6.1. Das Bernsteinsäure - Essigsäure - Benzylamin - Modell (ZP 1) und das isomere Modell (ZP 2)

Einführung

Das zuerst gewählte Modell entspricht einem Zwischenprodukt, ...e es in einer Kupplung von Essigsäure mit Benzylamin unter Zusatz ...n HOSu und DCCI aufträte, wenn diese entsprechend den Hypothesen ...l oder 2b ablaufen würde. Das isomere ZP 2 wurde zur genaueren ...ukturabklärung des ZP 1 herangezogen. Synthese, Reaktionen und ...lytik der beiden Verbindungen werden in den Kapiteln 7.1., 7.2. ...l 7.3. näher erläutert.

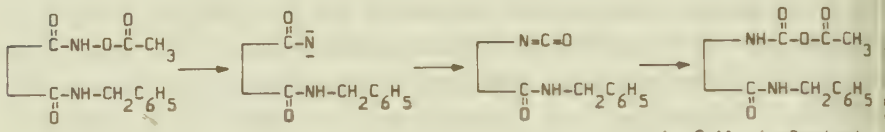
ZP 1 wie auch ZP 2 sind bei Zimmertemperatur thermisch ...bil. Eine Unstabilität des ZP 1 - wenn man also aus der Synthese ...telle des ZP 1 gerade HOSu und Acetylbenzylamid als Produkte ...liert hätte - wäre ein wichtiges Indiz für die Hypothesen 2a ...r 2b gewesen.

So aber müssen zuerst die Bedingungen untersucht werden, ...che die gewünschte Umlagerung auslösen.

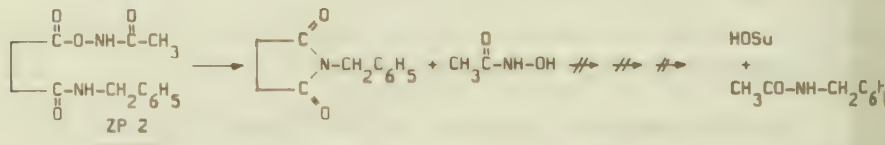
Die Umlagerung von ZP 1 und ZP 2

Es wurde zunächst versucht, das ZP 1 durch Aenderung des ...mischen Milieus zur Umlagerung zu bringen. Weder der Zusatz ... Base wie Kalium-tertiär-butylat, noch der von Säuren wie Essig-...e oder die Lewissäure Bortrifluorid als Aether-Komplex, führ-...n zum Erfolg. Erst die Beobachtung, dass eine Substanzprobe nach ...r ersten Schmelzpunktsbestimmung und Abkühlung einen beträcht-... tieferen und breiteren zweiten Schmelzpunkt aufweist, liess ...nnen, dass bei höherer Temperatur eine Reaktion einsetzt. ...i Differentialthermoanalyse (DTA) zeigt nach einer anfänglichen, ...h den beginnenden Schmelzvorgang bedingten Energieaufnahme eine ...hliessende exotherme Reaktion an. Im DC einer geschmolzenen

Probe weist man HOSu und Acetylbenzylamid nach; ferner zu einigen Prozenten ein Nebenprodukt. Dadurch, dass eine saure Totalhydrolyse aller Umlagerungsprodukte im Bombenrohr neben Bernsteinsäure und Benzylaminhydrochlorid auch einen geringen Anteil an β-Alanin ergibt, dürfte dieses Nebenprodukt auf eine bei der Erwärmung parallel ablaufende Lossen-Umlagerung zurückzuführen sein:

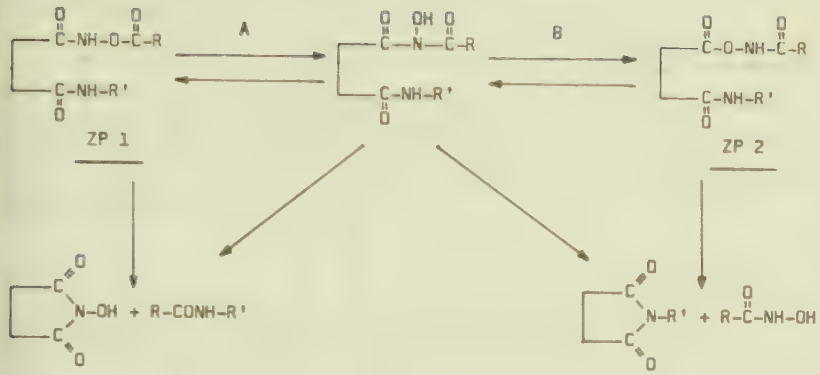


Auch das ZP 2 erfährt bei seinem Schmelzpunkt eine thermische Umlagerung, die nach der DTA ebenfalls exotherm nach dem (endothermen) Schmelzpunkt einsetzt. Der endotherme Peak bei 136° entspricht dem im Kapitel 7.2. erwähnten Kristallumwandlungspunkt. Als Umlagerungsprodukte findet man hier neben den beiden erwarteten (N-Benzyl-succinimid und Acethydroxamsäure) auch noch HOSu und Acetylbenzylamid, d.h. die Umlagerungsprodukte des ZP 1. Dabei kann deren Entstehung nicht auf irgend eine Folgereaktion vom Typ



zurückzuführen sein, denn N-Benzyl-succinimid und Acethydroxamsäure reagieren unter entsprechenden Bedingungen nicht miteinander.

Es werden deshalb für den ganzen Reaktionskomplex die folgenden Hypothesen vorgeschlagen:

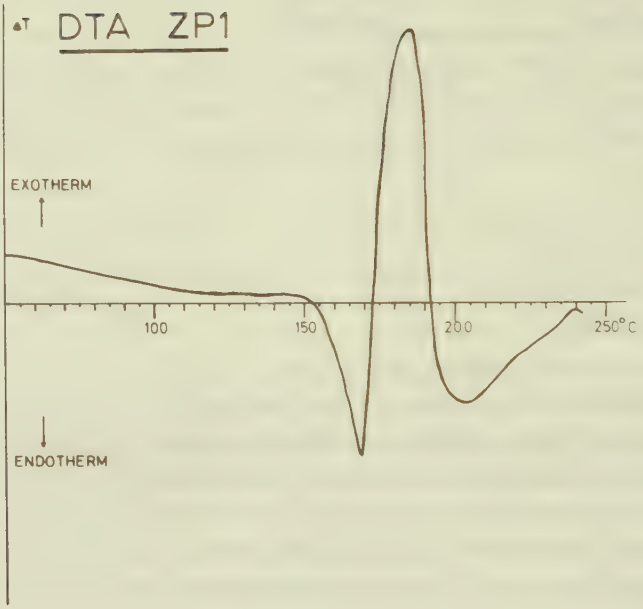


ne Ueberführung des einen in das andere ZP wäre über eine Hydroxy-imid-Form denkbar. Diese könnte ihrerseits zu beiden Produktgruppen umlagern oder aber nur die Umwandlung zwischen den Isomeren vermitteln. Die thermische Umlagerung des ZP 1 liefert wohl in diesem Falle nur HOSu und Acetylbenzylamid, sie könnte aber auch, wie beim entsprechenden Phthalsäuremodell (vgl. Kap. 5.6.2.) gezeigt wird, in beiden Richtungen verlaufen. Es wäre also eine Frage der Lage und Aktivierungsenergien der beiden Umwandlungsgleichgewichte A und B; liegen sie mehr auf der N-Hydroxy-imid-Seite, so erfolgten beide Umlagerungstypen, liegen sie mehr auf der Seite eines der andern ZP, so erfolgte nur eine.

Um einen Anhaltspunkt für die Geschwindigkeiten der Umlagerungen zu erhalten wurden DC-Versuchsreihen durchgeführt. Das Fortschreiten der Umlagerung wurde dabei nach der Abnahme des ZP 1 bzw. ZP 2 - Flecks im DC beurteilt. Beide Verbindungen weisen etwa dieselben Werte auf:

- bei 170° erfolgt die gesamte Umlagerung in etwa 12 Minuten,
- bei 145° ist sie nach 32 Minuten etwa zur Hälfte abgelaufen,
- bei 120° ist nach 32 Minuten praktisch keine Reaktion festzustellen.

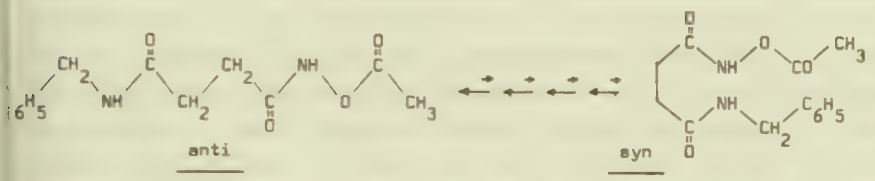
Diese Werte gelten für die feste Substanz im zugeschmolzenen Röhrchen. Wird in Lösungsmitteln wie THF oder Chloroform gearbeitet,


ΔT
DTA ZP1
EXOTHERM
100
150
200
250°C
ENDOTHERM

ΔT
DTA ZP2
EXOTHERM
100
150
200
250°C
ENDOTHERM

o ergibt sich für das ZP 1 keine Veränderung, für das ZP 2 eine eringe Verzögerung (genauere Angaben im Kapitel 17.).

Man kann sich nun noch fragen, welche Voraussetzungen ur Einleitung der Umlagerung erfüllt sein müssen. Erstens ist estzuhalten, dass sich Bernsteinsäure-Derivate offensichtlich ier in einer gestreckten (anti-, bezüglich der beiden Methylen-uppen) Form befinden:



e Boltzmann-Verteilung zwischen anti- und syn-Form wird sich i Temperaturerhöhung zu Gunsten der syn-Form verschieben. Dies deutet eine Zunahme der Konzentration der reaktiven syn-Form. eitens erhöht sich gleichzeitig der relative Anteil an a k t i - i e r t e n syn-Partikeln, sodass sich in doppelter Beziehung ie Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit ergibt.

Man kann sich nun zwei Möglichkeiten vorstellen, die ktionsfreudigere Konformation zu stabilisieren und damit die agerung bei tieferen Temperaturen ablaufen zu lassen:

- man könnte die syn-Konformation durch Aenderung der Konstitution des Moleküls erzwingen. Dies führt zum Phthalsäuremodell (vgl. Kap. 5.6.2.)
- Man könnte diese Konformation aber auch dadurch bevorzugen, dass man im Modell eine Säure und eine Base einbaut, die miteinander assoziieren können. Dazu geeignet wären Peptidpaare (Kap. 5.6.4.) oder Säuren und Basen mit langen aliphatischen Substituenten (Kap. 5.6.3.), die zu lipophilen Wechselwirkungen befähigt wären.

5.6.2. Das Phthalsäure - Essigsäure - Benzylamin - Modell (ZP 3)

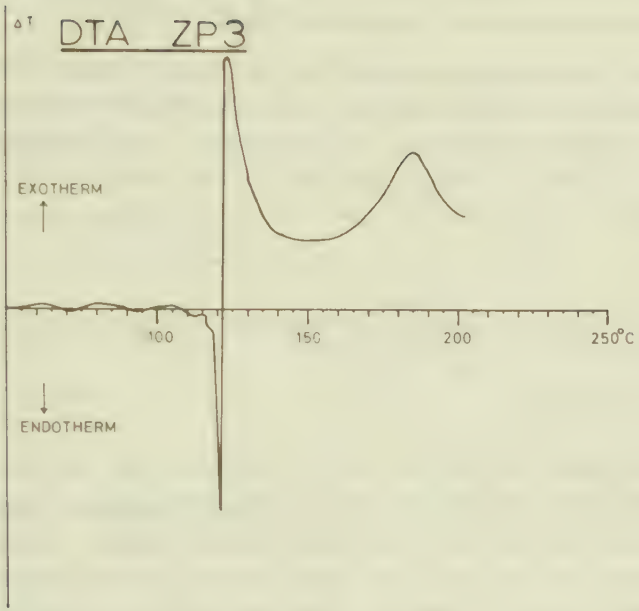
Einführung

Vom theoretischen Standpunkt aus lässt sich in allen im Kapitel 4. besprochenen Hypothesen das HOSu durch HOPhth ersetzen. Diese Verbindung hat, wie schon erwähnt (Kap.3.1.), eine entsprechende Wirkung wie HOSu in der Wünsch-Kupplung, es liegen aber noch keine Erfahrungen mit grossen Peptiden vor. - Im Zusammenhang mit der hier untersuchten Umlagerung ist besonders hervorzuheben, dass in der Phthalsäure und ihren Derivaten die sterische Anordnung der beiden Carbonylgruppen in der syn-Form stabilisiert bleibt. Es wäre daher zu erwarten, dass die in einem dem ZP 1 entsprechenden Zwischenprodukt daran angehängten Gruppen einander nahekämen und damit die Umlagerung mit grösserer Geschwindigkeit ablaufen sollte.

Die Umlagerung des ZP 3

Das ZP 3 lagert, wie vermutet, bei milderen Bedingungen um als ZP 1 und 2. Tatsächlich kann man sogar bei Zimmertemperatur nach etwa einer Woche die Umlagerungsprodukte Acetylbenzylamin, HOPhth und daneben auch N-Benzyl-phthalimid und Acethydroxamsäure im DC nachweisen, wenn man das reine ZP 3 in abs. THF stehen lässt.

Die Differentialthermoanalyse lässt nach dem endothermen Schmelzbeginn einen jähen Einsatz der exothermen Umlagerung über 120°C erkennen:



Die Umlagerungsdauer in abs. THF bei 100° beträgt beim
' 3 etwa 3 - 6 Minuten. Ein direkter Vergleich zu den ZP 1 und 2
sst sich mit der gewählten Analysenmethode (DC - Vergleich)
cht anstellen. Benützt man die RG-T-Regel, die besagt, dass
.ne Reaktion nach einer Temperaturerhöhung von 10° etwa doppelt
schnell abläuft, so ergibt sich als grobe Schätzung für das
3 eine Beschleunigung um einen Faktor von etwa 250. (ZP 1
gert bei 170° in ca 12 Minuten um.).

Zur Erklärung dieses beträchtlichen Effekts sei einerseits
f die in der Einführung gemachten Ueberlegungen bezüglich der
aktionsfördernden, günstigeren sterischen Gegebenheiten im
thalsäuremodell hingewiesen. In welcher Weise der Phenylring
d das zweite Carbonyl der Phthalsäure die Reaktionsgeschwindig-
it beeinflussen, lässt sich nicht ohne weiteres abschätzen.

Alle diese Umlagerungsversuche des ZP 3 (auch bei 20°C)
ssen im DC aber auch einen deutlichen Anteil an N-Benzylphthal-
id (ca 10 - 30 %) und Acethydroxamsäure erkennen. Diese Produkte

könnten nach der im Kapitel 5.6.1. skizzierten Hypothese über ein Umwandlungsgleichgewicht entstanden sein.

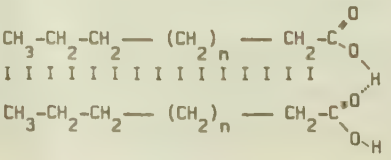
Die für das Phthalsäuremodell erwartete Beschleunigung der Umlagerung tritt also tatsächlich auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei Zimmertemperatur ist aber immer noch bedeutend zu klein für die postulierten Mechanismen 2a und 2b. Noch ungünstiger werden deren Chancen aber vor allem durch die beobachteten Nebenprodukte

5.6.3. Das Bernsteinsäure - Laurinsäure - Dodecylamin - Modell (

Einführung

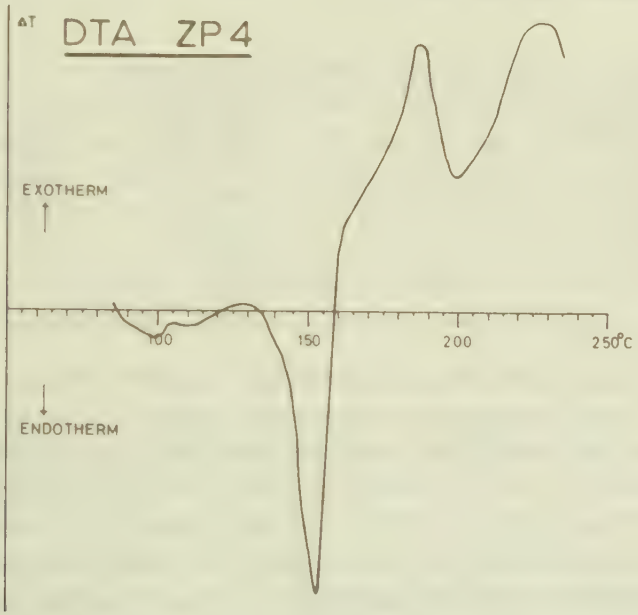
Wie schon im Kapitel 5.6.1. vorgeschlagen wurde, sollte in das Modellzwischenprodukt nun ein Säure-Basenpaar eingebaut werden, das Assoziationen ausbilden könnte. Dadurch sollte die zwar sterisch weniger günstige syn-Form der Bernsteinsäure stabilisiert werden, da nur über sie die intramolekulare Umlagerung erfolgen kann. Die Assoziation würde also zur Erhaltung der reaktionsfreudigeren syn-Konformation beitragen.

Zunächst sollte dazu die hydrophobe Wechselwirkung (61) zweier langer, unverzweigter Kohlenwasserstoff-Ketten ausgenützt werden. Als Beispiel wurden Laurinsäure und Dodecylamin gewählt. Solche Assoziationen sind schon von der Mizellbildung von Seifen (40, 64) bekannt. Schrier, Pottle und Scheraga (62) und Mukerjee (63) haben gezeigt, dass man die Zunahme der Dimerisierungskonstanten von Carbonsäuren mit der Kettenlänge (Ameisensäure < Essigsäure < Propionsäure < Buttersäure < Phenylessigsäure) in Wasser erklären kann, wenn man zwischen den unpolaren Seitenketten der dimeren Säuren hydrophobe Bindungen annimmt:



Die Umlagerung des ZP 4

Das ZP 4 ist eine bei 20°C stabile Verbindung. Die DTA eigt eine nach dem Schmelzpunkt (149-151°C) einsetzende exo-therme Reaktion:



Als Produkte der thermischen Umlagerung werden entsprechend dem ZP 1 HOSu und Laurinsäure-dodecylamid gefunden. Im S c h m e l z f l u s s bei 150°C ist die Umlagerung nach etwa Minuten beendet. Dies entspricht einer Beschleunigung dieser aktion gegenüber jener des ZP 1 von nur etwa 4, was keinen nnenswerten Effekt darstellt.

Es interessiert nun hauptsächlich das Verhalten des ZP 4 verschiedenen L ö s u n g s m i t t e l n . Man könnte nach in der Einführung Gesagten erwarten, dass die Umlagerung in aren Lösungsmitteln, vor allem in Wasser, infolge der postu-rten hydrophoben Wechselwirkungen der Kohlenwasserstoffreste cher vonstatten ginge als in unpolaren. Leider erwiesen sich se Annahmen als falsch, wie die in der folgenden Tabelle auf-führten relativen Umlagerungsgeschwindigkeiten (Ausgangspro-

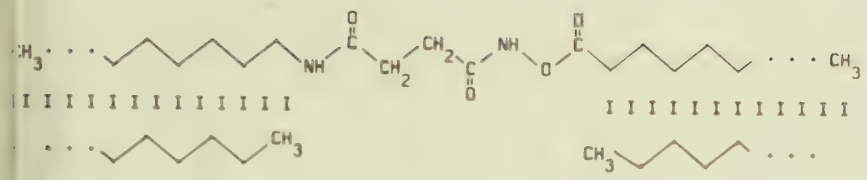
dukt zu 90 % verschwunden) zeigen:

Relative Umlagerungsgeschwindigkeiten des ZP 4 in verschiedenen Lösungsmitteln bei 150° (Auszug aus der Tabelle im Kapitel 17.)

	v_{rel}			v_{rel}
Schmelzreaktion	4	Formamid		2
n-Heptan	2	THF abs.		~0,5
$CHCl_3$	2	THF/H_2O	3:1	0,5
DMF*	< 1	THF/H_2O	1:1	1
DMSO	< 1	THF/H_2O	1:3	2
CH_3OH	~1	H_2O		~2
		$(i\text{-Prop})_2\text{-N-Et}$		8

Wohl nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit in einer THF/H_2O-Mischungsreihe mit steigendem Wassergehalt etwas zu, aber in n-Heptan, als eindeutig unpolarem Lösungsmittel, lagert das ZP 4 gleich schnell um wie in Wasser. Die einzige bemerkenswerte Beschleunigung erfolgt in N-Di-isopropyl-äthyl-amin. Dieser Effekt dürfte aber auf die spezifische Protonenakzeptorwirkung dieser Hünig-Base (65) zurückzuführen sein: Eine aktive Entfernung des Hydroxamsäure-NH-Protons kann die Umlagerung ebenfalls erleichtern, indem die Nucleophilie dieses Stickstoffs erhöht wird.

Das Ausbleiben eines deutlichen Effekts in polaren Lösungsmitteln könnte auf zwei Arten gedeutet werden: Entweder reicht die aus der lyophilen Wechselwirkung resultierende Energie nicht zur Stabilisierung der syn-Konformation der Bernsteinsäure aus, oder es bilden sich nicht die geforderten i n t r a molekularen Assoziationen aus, sondern i n t e r molekulare vom folgenden Typ (Mizellen-artig):



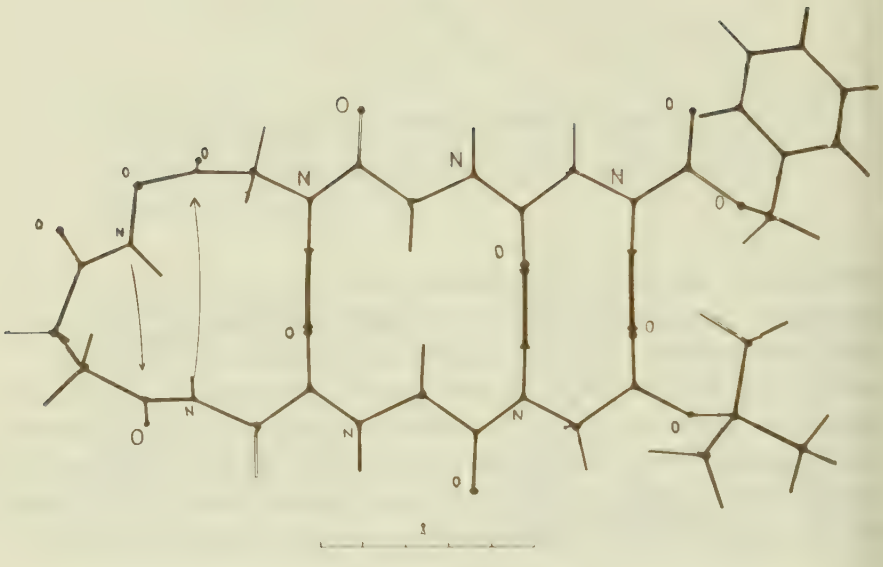
Schliesslich sei darauf hingewiesen, dass am Beispiel des ZP 4 die Umlagerung auch photochemisch durch UV-Bestrahlung bei 20°C ausgelöst werden kann. (Die übrigen ZP wurden daraufhin nicht geprüft). Das ZP 4 zeigt im UV eine Absorptionsbande bei 218 mμ mit einer Extinktion von ε = 1300, was auf eine geringe Quantenausbeute schliessen lässt. Tatsächlich muss einige Stunden lang belichtet werden. Diese Reaktion wurde aber nicht genauer untersucht, da sie mit den hypothetischen Mechanismen in keinem Zusammenhang steht.

4.6.4. Das Bernsteinsäure - Z-$(Gly)_3$-OH - H-$(Gly)_3$-OtBu - Modell (ZP 5)

Einführung

Peptide haben eine ausgeprägte Assoziationstendenz (66). Als intramolekulare Assoziate sind die α- und β-Helix bekannt, als intermolekulare die verschiedenen Formen der pleated sheets. Treibende Kräfte für diese Sekundärstrukturen sind einerseits Wasserstoffbrücken zwischen Carbonyl-Sauerstoff und Amid-Proton, andererseits hydrophobe Wechselwirkungen der apolaren Substituenten.

Nach diesen Befunden und auch weil die in den Kapiteln 4.2 und 4.3. aufgestellten Hypothesen ja für Peptide Gültigkeit haben sollen liegt es nahe, geeignete Peptide für den Bau von Modellsubstanzen einzusetzen. Dreiding-Modelle von solchen Zwischenprodukten lassen als günstige Assoziationsmöglichkeiten das antiparallele pleated sheet zu. Dies ergäbe in der Normalprojektion etwa die folgende Situation:



Nach dem Modell beurteilt sind die beiden eingezeichneten nucleophilen Angriffe durchaus möglich. Allenfalls kann die erste Wasserstoffbrücke nicht voll zur Wirkung kommen.

Es war anfänglich vorgesehen Pentaglycylglycin in das Modellzwischenprodukt einzubauen. Vorversuche zeigten jedoch, dass mit diesen Verbindungen beträchtliche synthetische Schwierigkeiten infolge schlechter Löslichkeit entstehen. Deshalb wurden zunächst das Komponentenpaar Carbobenzoxy-di-glycyl-glycin (Z-$(Gly)_3$OH) und Di-glycyl-glycin-tertiär-butylester (H-$(Gly)_3$-OtBu) gewählt.

Die Umlagerung des ZP 5

Das ZP 5 besitzt keinen eigentlichen Schmelzpunkt. Bei etwa 200°C setzt eine spontane Verkohlung ein, wie dies z.B. auch bei Derivaten des Pentaglycylglycins zu beobachten ist. Dementsprechend zeigt die DTA keinen endothermen Peak sondern, über 150° das langsame und unregelmässige Einsetzen einer exothermen Reaktio

:hitzt man das ZP 5 auf 150°C, so findet man im DC HOSu und
ırbobenzoxypentaglycylglycin-tert.-butylester. Die Umlagerung
ıt nach etwa 6 Minuten beendet. Dies entspricht einem Beschleu-
.gungsfaktor von etwa 8 gegenüber dem ZP 1 und von etwa 2 gegen-
)er dem ZP 4.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass für die Kupplung
)n zwei Tripeptiden wie Z-$(Gly)_3$-OH und H-$(Gly)_3$-OtBu Mechanis-
n wie die Hypothesen 2a und 2b kaum in Frage kommen. Die theo-
tisch geforderte Begünstigung der Umlagerung durch die Assozia-
on der beiden Peptidkomponenten tritt nicht oder nur in gerin-
m Masse auf. Aus Dreiding-Modellen ist ersichtlich, dass nur
ei oder höchstens drei Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung
r Konformation in Frage kommen.

5.6.5. Versuche mit ACTH-Peptidsequenzen (ZP 6)

Wie im Kapitel 3.1. dargelegt wurde sind günstige Resultate der Wünsch-Methode vor allem bei der Kupplung grösserer Peptide beobachtet worden. Es wäre demnach nicht ausgeschlossen, dass grosse Peptide nach einem anderen Mechanismus kuppelten als kleine. Die Ergebnisse der Triglycinversuche, wonach das ZP 5 nicht bei 20°C, wohl aber bei höheren Temperaturen umlagern kann, könnten durch die Postulierung einer zu geringen Zahl möglicher Wasserstoffbrücken interpretiert werden. Demzufolge wäre ein grösseres Peptidpaar mit entsprechend mehr Haftstellen und der Möglichkeit zusätzlicher hydrophober Wechselwirkungen eher in der Lage, die zur Umlagerung erforderliche syn-Konformation der Bernsteinsäure zu stabilisieren.

Aus industrieller Synthese zur Verfügung stehende grössere Peptidsequenzen sollten deshalb zum Aufbau eines entsprechenden Zwischenprodukts verwendet werden. Iselin konnte bei der Kupplung der Teilsequenz BOC-ACTH-1-10-OH (N-geschütztes Decapeptid) mit H-ACTH-11-24-OtBu (Carboxyl-geschütztes Tetradecosapeptid) nach der Wünsch-Vorschrift gegenüber andern Methoden gute Ergebnisse bezüglich Ausbeute und Reinheit der Produkte erzielen (34).

Die durchgeführten Versuche zeitigten aber beträchtliche synthetische und analytische Schwierigkeiten. Es ist deshalb mit diesem Peptidpaar nicht gelungen, ein entsprechendes Zwischenprodukt (ZP 6) zur Umlagerung zu bringen. Nähere Angaben finden sich im Kapitel 7.7.

Diskussion

Reaktionsmechanismen lassen sich bekanntlich nicht be-
isen, sondern nur widerlegen. Es stellt sich jetzt also die
lgende Frage: Sind die Hypothesen 1 - 3 mit den in dieser Arbeit
schriebenen neuen experimentellen Fakten verträglich?

Hypothese 1

Charakteristisch sind zwei Postulate: Assoziatbildung
schen den Kupplungskomponenten und Protonierung von O-Acyl-
timen durch HOSu in Gegenwart von THF als Lösungsmittel.

Die osmometrischen und viskosimetrischen Untersuchungen
1. Kap. 5.1.) lassen Assoziatbildungen kleinerer Peptide im
sch'schen Reaktionsmilieu als durchaus möglich erscheinen, und
e gewisse Acidität von HOSu gegenüber Addukten von DCCI mit
erstoffverbindungen ist erwiesen. Lässt sich also Hypothese 1
mal nicht ausschliessen, so bestehen doch andrerseits erheb-
he Bedenken. Es müssten alle speziellen Effekte der Assoziation
uschreiben sein, und es fehlt eine Erklärung für die spezifische
kung der Säuren HOSu und HN_3. Interessant wäre in diesem Zusam-
nang eine nähere Abklärung der im Kapitel 5.1. gemachten Fest-
llung, dass HOSu die Assoziationsfähigkeit von Peptiden beein-
sst oder selbst mit ihnen assoziiert.

Hypothese 2a

Charakteristisch ist erstens die Umlagerung einer in
lung Carbonylpeptid-substituierten O-Peptidyl-hydroxamsäure

und zweitens die Bildungsweise des gemischten Anhydrids über eine primäre Oeffnung von HOSu durch die Basenkomponente zu einer in γ-Stellung Carbonylpeptid-substituierten Hydroxamsäure.

Experimentell hat dazu gezeigt werden können, dass der HOSu bzw. HOPhth-Ring durch primäre Amine tatsächlich rasch im erwarteten Sinn, wenn auch unvollständig (Gleichgewichtsreaktion) geöffnet wird; die Hauptmenge der Reaktionskomponenten wird allerdings im Modellversuch durch Salzbildung immobilisiert.

Ebenso darf auf Grund der Modellversuche (Kap.7) die O-Acylierbarkeit von Hydroxamsäuren durch Carbonsäuren und DCCI als erwiesen betrachtet werden.

Schliesslich war es auch möglich, im Modellversuch die postulierte intramolekulare Umlagerung der O-Acyl-hydroxamsäure zu verifizieren. Die Umlagerung erfolgte aber, ausser beim Phthalsäure-Modell, erst bei höheren Temperaturen. Beim Phthalsäure-Modell ist die Umlagerungsgeschwindigkeit bei Zimmertemperatur um vieles geringer als die Geschwindigkeit einer Wünsch-Kupplung. Den Unterschied auf eine günstigere sterische Situation (durch Assoziation der Peptidpartner, vgl. Kap. 5.6.3. und 5.6.4.) bei der Wünsch-Reaktion zurückzuführen, erscheint nicht als zulässig. Man gelangt also aus kinetischen Gründen zur Ablehnung der Hypothese 2a.

Hypothese 2b

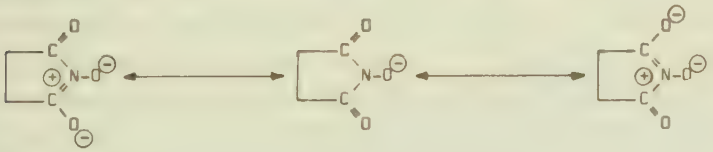
Sie unterscheidet sich von der Hypothese 2a lediglich in der Primärreaktion. Es erübrigt sich, diese nochmals im einzelnen zu diskutieren, da, wie soeben gezeigt, die Hauptreaktion kinetisch nicht in Frage kommt. Hypothese 2b ist demnach ebenfalls fallenzulassen.

Hypothese 3

Das Postulat einer konzertierten Reaktion zwischen einem Peptidkomponenten-Assoziat und einem HOSu-DCCI-Addukt ist vertretbar, weil einfachere Deutungen wie die Hypothesen 1, 2a und 2b

rsagen. Nachdem die Annahme einer rein physikalisch-chemischen
ckungsweise von HOSu, HOPhth und HN_3 (Protonen-Donatoren)
cht befriedigt, nachdem weiter klassisch-chemische Reaktionen
n HOSu und HOPhth kinetisch enttäuschen und nachdem schliess-
ch das Assoziationskonzept für sich allein nicht wirklich trag-
nig ist, erscheint die Einführung eines neuen Parameters geboten.
s Konzept einer konzertierten Reaktionsweise ist Vorstellungen
s der neueren Enzym-Chemie entnommen; schnelle Reaktionsfolgen
nd dort immer Ausdruck einer sterischen Ausrichtung der betei-
ten Reaktionszentren; der turnover wird dann besonders gross,
n die Intermediärprodukte sich nicht, wie es bei ungeordneten
ktionen in Lösung der Fall ist, jedesmal beispielsweise durch
vatation stabilisieren, sondern auf dem Energieniveau ihrer un-
telbaren Bildung weiterreagieren.

In der Hypothese 1 erscheint das Anion von HOSu als ein
ermediär auftretendes, im übrigen aber an der Reaktion unbe-
ligtes Nebenprodukt. Nun ist aber dieses Anion ein polyvalen-
und deshalb sterisch idealer Protonenakzeptor:



Dasselbe gilt für HOPhth und für das Azidion,

t aber unbedingt für das Anion von N-Hydroxy-bis-acetimid.
beachte, dass die Abstände der basischen Stellen in allen
en Anionen von derselben Grössenordnung sind. Es erscheint
liegend, die Anionen nicht als kinetisch freie Partikel zu
en; die Leitfähigkeitserhöhung bei der Zugabe von HOSu zum
-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff darf nicht darüber hin-
äuschen, dass die absolute Zahl an f r e i e n Ionen sehr
ng bleibt. Man darf also annehmen, dass die Anionen, welche
Protonierungsvorgängen entstehen, im Reaktionsknäuel bleiben.

Bringen sie Polyvalenz und einen geeigneten räumlichen Bau mit sich, so könnten sie als Protonen a k z e p t o r e n einen wesentlichen Einfluss auf Vorgänge im Reaktionsknäuel ausüben. - In diesem Sinn wird Hypothese 3 zur Diskussion gestellt.

Es ist natürlich schwierig, Experimente zu konzipieren, welche geeignet sind, ein solches Konzept zu testen. Die Techniken aus der Enzym-Chemie, welche man mit Erfolg in solchen Fällen anwendet (z.B. Relaxationsmethoden), setzen die Umkehrbarkeit der katalysierten Reaktionsfolge voraus. Sie ist im vorliegenden Fall natürlich nicht gegeben. Es bleibt somit nur noch die Möglichkeit, die Hypothese 3 durch Zusätze potentieller Inhibitoren der Assoziation oder der Protonierung zu prüfen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist eine solche Untersuchung nicht mehr möglich gewesen.

Weitere Resultate der Arbeit

Abgesehen von den soeben besprochenen Aussagen zum Mechanismus der Wünsch-Kupplung ist als ein Resultat die experimentelle Demonstration einer neuen, theoretisch konzipierten Umlagerung von Verbindungen des Typs ZP 1 - 5 (vgl. Kap.5.6.) anzumerken, welche man als Amid-hydroxyimid-Disproportionierung bezeichnen kann.

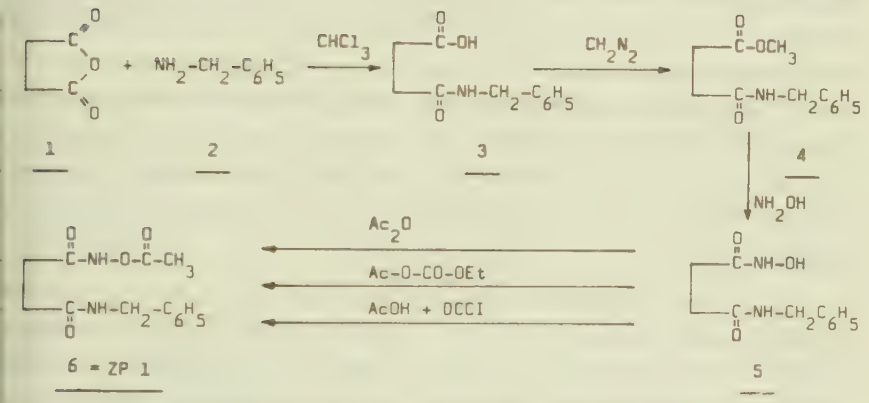
Ob dieser Reaktion eine allgemeinere synthetische Bedeutung zukommt, kann nach den bisherigen Ergebnissen nicht entschieden werden. Es wäre beispielsweise eine farbenchemische Anwendung denkbar: bei geeigneter Wahl der Substituenten am Zwischenprodukt könnte durch photochemische oder thermische Anregung eine Farberzeugung oder -änderung erzielt werden. - Experimentelle Studien in dieser Richtung mussten mit Rücksicht auf die Problemstellung der Dissertation unterbleiben.

Die Darstellungsmethode von Succinylaminosäure-estern durch Behandlung der leicht zugänglichen 3-(Methoxycarbonyl-)-propionaminosäure-ester mit katalytischen Mengen von Alkoholat ist von präparativem Interesse - unter der Voraussetzung allerdings, dass keine Racemisierung am Asymmetriezentrum der Aminosäure eintritt.(Kap.

Die Synthesen der Modellzwischenprodukte.

1. Synthese des ZP 1.

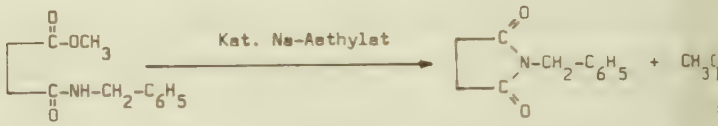
Die Synthese des ZP 1 wurde nach folgendem Schema durchgeführt:



Der Umsatz des Bernsteinsäureanhydrids mit Benzylamin und folgende Veresterung mit Diazomethan bieten keine Schwierigkeiten. Im IR-Spektrum erkennt man zunächst den Ersatz der beiden Kombinationsbanden des Bernsteinsäureanhydrids bei 1760 und 1840 durch Amid- (3300, 1640, 1540 cm^{-1}) und eine Säurebande (1690), nach dem zweiten Schritt die Substitution der Säure durch Esterbande (1740 cm^{-1}). Das NMR-Spektrum von 4 zeigt ein Trip- bei 2,48 ppm (Methylen der Bernsteinsäure), ein Singlett bei 3,54 ppm (Methyl), ein Dublett bei 4,24ppm und ein Singlett 7,22 ppm (Benzyl) und eine breite Bande um 8,25 ppm (NH).

Der nun folgende Umsatz vom Methylester 4 zur Hydroxamsäure reitete zunächst einige Schwierigkeiten. Setzt man 4 mit einer holischen Hydroxylaminlösung um, die man nur durch Freisetzen Hydroxylamin-hydrochlorid mit der theoretischen Menge Natrium- lat und Filtrieren des Kochsalzes gewonnen hat, so erhält man

keine Hydroxamsäure sondern N-Benzyl-succinimid, das durch den Schmelzpunkt, das IR-Spektrum (1700, 1770 cm^{-1}), die Analyse und das Molekulargewicht sichergestellt wurde.



Eine genauere Untersuchung lässt erkennen, dass dieser Ri schluss nicht durch das Hydroxylamin, sondern durch katalytisch Mengen von Alkoholat bewirkt wird, das von der Freisetzung des droxylamins herstammt. Es genügt, zu einer Lösung von 4 in Alko einen oder zwei Tropfen Alkoholatlösung hinzuzufügen, um sofort einen Ringschluss auszulösen. Die Reaktion erfolgt auch mit Tri äthylamin, allerdings erheblich langsmer. Diese Ringschlussmeth wird im Kapitel 7.8. zur Darstellung von Succinylaminosäuren he gezogen.

Die gesuchte Hydroxamsäure 5 erhält man, wenn man das Hyd xylamin durch Umkristallisieren reinigt. Dazu ist die Methode v Lechner und Hoffmann (57) sehr gut geeignet (Ausfrieren des fre gesetzten Hydroxylamins bei -30° aus alkoholischer Lösung). Die bisher nicht beschriebene Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäur wurde charakterisiert durch den Hydroxamsäuretest mit $FeCl_3/HCl$ die Mikroanalyse, das IR-Spektrum (breite Assoziationsbande um 3300 cm^{-1}, Verschwinden der Esterschwingung) und das NMR-Spekt (Methylester-Singlett verschwunden, -NHOH -Signale kaum erkennb Methylengruppe der Bernsteinsäure nicht mehr als Triplett sond als sehr unregelmässiges Signal, wahrscheinlich durch die höhe Unsymmetrie des Moleküls hervorgerufen.). Die Verbindung kann, schon im Kapitel 5.4. erwähnt, bei langem Aufbewahren in Metha auch zu HOSu ringschliessen.

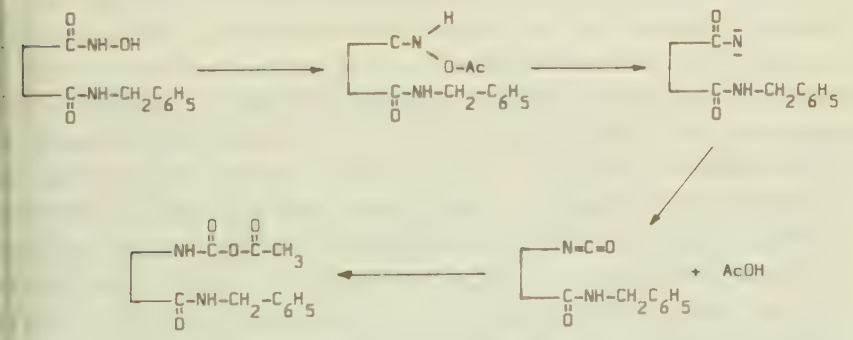
Die Acetylierung der Hydroxamsäure 5 gelingt auf 3 Arten:

- durch Umsatz mit Essigsäureanhydrid,
- durch Kupplung mit Essigsäure und DCCI,
- durch Umsatz mit dem gemischten Anhydrid aus Essigsä

d Kohlensäureäthylester (gem. Anhydrid-Methode).

Man erhält in jedem Fall dasselbe kristalline Produkt, das inen positiven Eisentest mehr ergibt und dessen Elementarana-se und osmometrisch bestimmtes Molekulargewicht auf die Struk-r 6 passen. Im IR-Spektrum tritt eine typische Anhydrid-Kombi-tionsbande bei 1790 cm^{-1} auf, während im NMR-Spektrum das neue nglett der Acetylgruppe (2,13 ppm) auffällt. Als Beobachtung sei ch beigefügt, dass der Austausch des (Benzyl-) Amidprotons gegen uterium im Falle der Hydroxamsäure sehr rasch, im acetylierten rivat dagegen sehr langsam erfolgt.

Man könnte nun noch vermuten, dass das erhalten Produkt eine ssen-Umlagerung nach folgender Gleichung erlitten hätte:



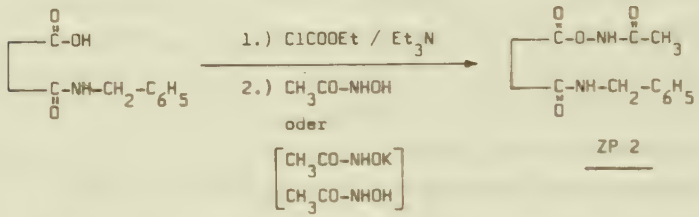
ein β-Alanin-Derivat

Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da eine saure Total-:olyse im Bombenrohr kein β-Alanin, sondern nur Benzylamin, nsteinsäure und Essigsäure lieferte.

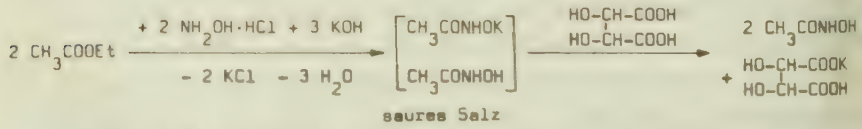
Dass tatsächlich eine O-Acylierung und nicht eine solche am kstoff stattgefunden hat, kann durch chemische Reaktionen, ver-hen mit jenen des isomeren (O-N-vertauschten, ZP 2) Moleküls esen werden.(Kap. 7.3.). Die erhoffte Umlagerung liess sich h chemische Methoden nicht erzwingen. Zum Erfolg verhalfen zwei ikalische Methoden: thermische und optische (UV) Anregung. e Ergebnisse wurden in den Kapiteln 5.6.1. und 5.6.3. disku-t.

7.2. Synthese des ZP 2.

Zur genaueren Abklärung der Struktur des im Kapitel 7.1. b
schriebenen Acetylierungsproduktes von Bernstein-4-benzylamid-1-
hydroxamsäure wurde versucht, durch einen inversen Synthesegang
eine isomere Verbindung herzustellen:



Diese "Kupplung" zwischen Bernsteinsäure-monobenzylamid u
Acethydroxamsäure verläuft ohne Schwierigkeiten, wenn als zweit
Komponente ein wohldefiniertes Produkt eingesetzt wird. Dafür h
sich als besonders geeignet das saure Kaliumsalz der Acethydrox
säure erwiesen, das man beim Umsatz von Essigsäureäthylester mi
Hydroxylamin-hydrochlorid und Kaliumhydroxyd in Methanol als sc
ne Nadeln mit definiertem Schmelzpunkt und Molekulargewicht erh
(Ein entsprechendes Natriumsalz konnte nicht kristallisiert wer
Aus diesem Kaliumsalz kann man mit der äquivalenten Menge Wein-
säure in absolutem Alkohol nach dem Filtrieren auch die freie,
stalline und wasserfreie Acethydroxamsäure gewinnen.



Man erhält damit in der obigen Kupplung dasselbe Produkt
(ZP 2). Dieses ist nicht identisch mit dem ZP 1 aus Kapitel 7.1
Wohl ist es nach der Mikroanalyse isomer, es weist aber unter d
Schmelzpunkt noch einen endothermen Kristallumwandlungspunkt (v
Kap. 5.6.1.) auf und ergibt in einem Mischschmelzpunkt mit ZP 1
eine Depression. Im IR-Spektrum findet sich ebenfalls an der St
le 1790 cm^{-1} eine Anhydridbande, jedoch ist der Rest des Spektr

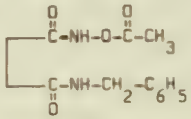
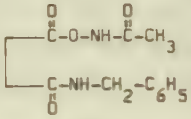
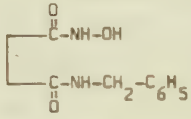
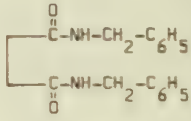
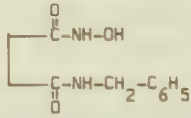
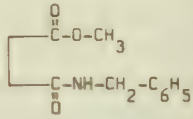
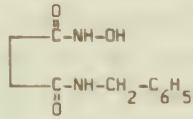
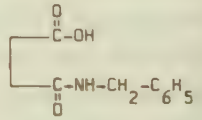
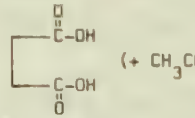
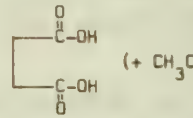
eutlich verschieden von dem des ZP 1. Im NMR-Spektrum erscheint er Acetat-Methyl-Peak bei 1,88 ppm, was darauf schliessen lässt, ass diese Gruppe sich in einer andern chemischen Umgebung befin-et als im ZP 1 (2,13 ppm); die übrigen Signale befinden sich etwa n denselben Stellen. Der H-D-Austausch des (Benzyl-) Amidprotons rfolgt ebenfalls sehr langsam.

3. Reaktionen mit den Zwischenprodukten ZP 1 und ZP 2.

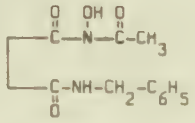
Die Richtigkeit der angegebenen Strukturen geht aus den Um-tzen mit verschiedenen Reagenzien bzw. aus den daraus resultie-nden Produkten hervor, die jeweils mit den theoretisch erwarte-n übereinstimmen. Ausgegangen wird dabei von der Beobachtung, ss die O-Acyl-Gruppe einer O-Acyl-Hydroxamsäure bevorzugt nuc-ophil angegriffen wird; diese Verbindung hat also acylierende genschaften (16, 17, 56). Die durchgeführten Versuche und deren odukte, die teils isoliert und analysiert, teils im DC nachge-esen wurden, sind in der Tabelle Seite 70 aufgeführt. icht nachgewiesene Produkte in Klammern).

Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Umsätze des ZP 2 sind, ter gleichen Bedingungen, allgemein höher als jene des ZP 1. shalb bemerkt man beim normalen Aufbewahren des ZP 2 in kristal-ner Form bei Zimmertemperatur schon nach wenigen Tagen eine nmelzpunktsdepression und im DC kann Acethydroxamsäure nachge-esen werden: Die Verbindung ist feuchtigkeitsempfindlich.

Reaktionen mit den ZP 1 und ZP 2.

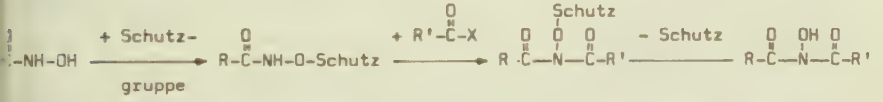
AUSGANGSPRODUKT : / REAGENZ :	 ZP 1	 ZP 2
$C_6H_5-CH_2-NH_2$	 + $CH_3CO-NH-CH_2-C_6H_5$	 + $CH_3CO-NH-OH$
CH_3-OH	 (+ CH_3COOCH_3)	 + $CH_3CO-NH-OH$
H_2O	 (+ CH_3COOH)	 + $CH_3CO-NH-OH$
CH_2N_2	keine Reaktion	keine Reaktion
H_2O / HCl	 (+ $NH_2OH \cdot HCl$) + $C_6H_5-CH_2-NH_2 \cdot HCl$	 (+ $NH_2OH \cdot HCl$) + $C_6H_5-CH_2-NH_2 \cdot HCl$

Die erhaltenen Reaktionsprodukte lassen sich also alle mit
en angegebenen Strukturen für ZP 1 und ZP 2 vereinbaren. Ein wei-
eres mögliches Isomeres, ein N-Hydroxy-imid



unn deshalb ausgeschlossen werden; es gäbe kaum diese eindeutigen
:aktionen und würde, wie beispielsweise auch HOSu, mit Diazo-
:than reagieren.

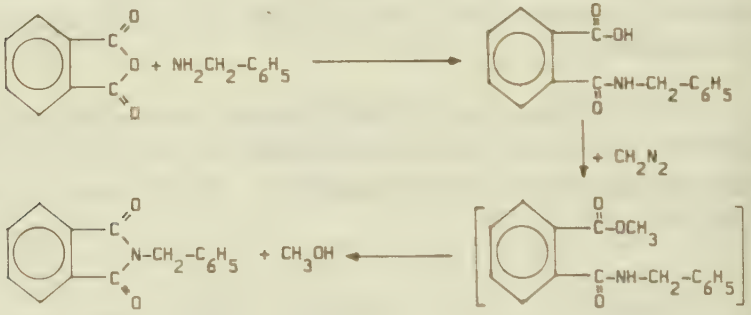
Es sei an dieser Stelle noch bemerkt, dass eine Untersuchung
n solchen N-Hydroxy-imid-Zwischenprodukten aus synthetischen
ünden Schwierigkeiten bereiten dürfte. Ihre Darstellung müsste
wa so erfolgen:



Es dürfte nicht ganz einfach sein, eine geeignete Schutz-
:ppe zu finden, da diese unter sehr milden Bedingungen selektiv
:spaltbar sein müsste. Eine bei dieser Abspaltung auftretende
:ontane Umlagerung könnte dann aber immer auch auf die Wirkung
:; Spaltungsreagens zurückgeführt werden. Ob wirklich das Hydroxy-
.d unter normalen Wünsch-Kupplungsbedingungen spontan umlagert,
inte daraus also nicht sicher abgeleitet werden. - In dieser
:htung wurden bisher keine Versuche unternommen.

7.4. Synthese des ZP 3

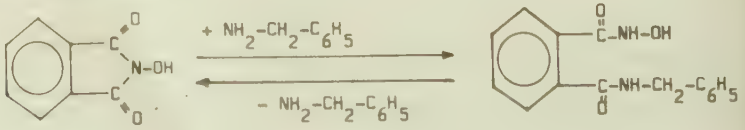
Versucht man das Phthalsäuremodell auf demselben Weg herzu-
stellen wie das ZP 1, so stösst man auf Schwierigkeiten: Der Um-
satz von Phthalsäure-monobenzylamid mit Diazomethan führt zum so-
fortigen Ringschluss der Verbindung auch unter schonendsten Be-
dingungen:



Die theoretisch nötige Menge an Diazomethan wird wohl ver-
braucht und damit der Ester gebildet, aber dieser verliert spont
Methanol. Dies ist nach den im Kapitel 5.6.2. gemachten Bemerkun
gen über die erwartete höhere Reaktivität von Phthalsäure-Deriva
ten ohne weiteres verständlich.

Der synthetisch erfolgreiche Weg führt über das Gleichge-
wicht zwischen HOPhth und Benzylamin, aus dem unter geeigneten B
dingungen N-Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure zur Kristallisation
gebracht werden kann.

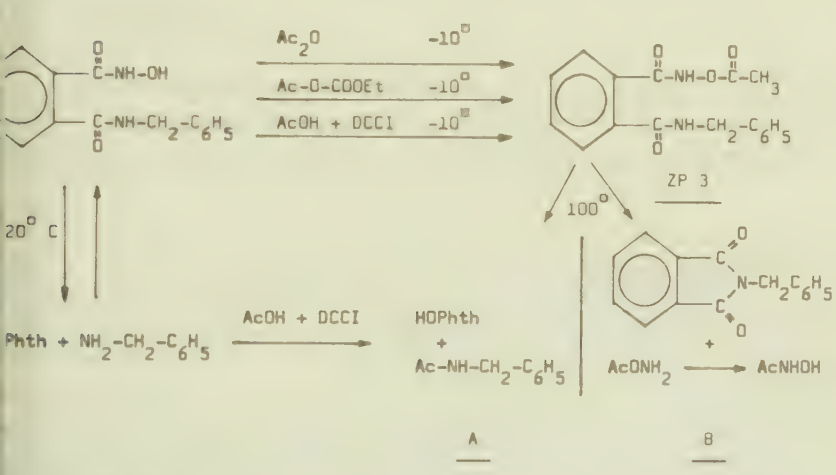
Dieses Gleichgewicht stellt sich schneller ein als das en
sprechende von HOSu.



N-Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure

Die Hydroxamsäure konnte wiederum durch ihre Mikroanalyse, s IR-Spektrum (sehr breite Assoziationsbanden um 3200 und 1600 cm^{-1}, Carbonylhauptbande bei 1620 cm^{-1}), das NMR-Spektrum (Methyl--Dublett: 4,45 ppm, 2 Aromaten-Multipletts: ca 7,3 und 7,5 ppm, -Triplett: 8,73 ppm und NHOH: sehr breit um 9,7 ppm) und den sentest analysiert und charakterisiert werden.

Die Acetylierung der Hydroxamsäure zum ZP 3 wurde, ausser t Acetanhydrid, wieder über die beiden Peptidkupplungsmethoden t DCCI bzw. Chlorameisensäure-äthylester und Essigsäure versucht.



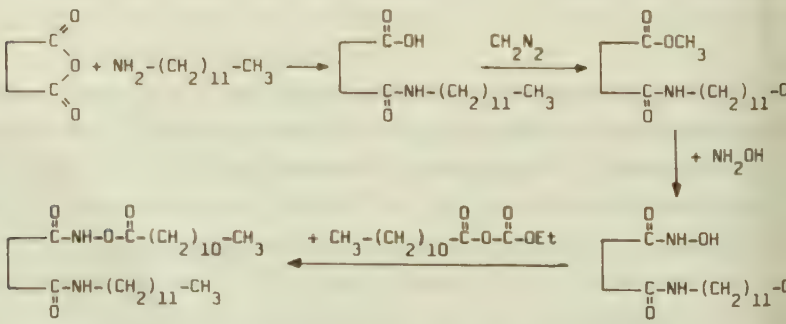
Auf allen Wegen findet diese Reaktion statt, ohne dass Umla- ungsprodukte aufträten, aber nur, wenn bei -10^{0} gearbeitet wird.

Führt man die Acylierung hingegen bei 20° durch, was nur bei DCCI-Methode möglich ist, so erkennt man schon nach 15 Stunden Umlagerungsprodukte A und auch einen sehr geringen Anteil an B. eine genauere Untersuchung zeigt, sind diese Produkte jedoch ht auf eine Umlagerung zurückzuführen, sondern auf das schon er- nte Gleichgewicht zwischen der Hydroxamsäure einerseits und hth und Benzylamin andrerseits. Offensichtlich spielt dieses ichgewicht bei -10° nur langsam, verglichen mit der Acetylier- s-Reaktion. Bei 20° dagegen eliminiert die Hydroxamsäure dauernd

Benzylamin, das nun seinerseits ebenfalls acyliert wird, sodass Endeffekt ebenfalls HOPhth und Acetylbenzylamid nachgewiesen wer den können. Diese Erklärung konnte bestätigt werden durch die Be obachtung, dass auch bei 20° mehr ZP3 und weniger Acetylbenzylam entsteht, wenn der Reaktion steigende Mengen an HOPhth zugesetzt werden. Wie erwartet verschiebt sich damit das Gleichgewicht meh auf die Seite der Hydroxamsäure. - Das ZP 3 konnte durch seine Mikroanalyse, das IR-Spektrum (Anhydridbande bei 1790 cm^{-1}) und das NMR-Spektrum analysiert und charakterisiert werden.

7.5. Synthese des ZP 4

Die Synthese des ZP4 erfolgte wieder nach dem gleichen Sch ma wie jene des ZP 1 (vgl. Kap. 7.1.):



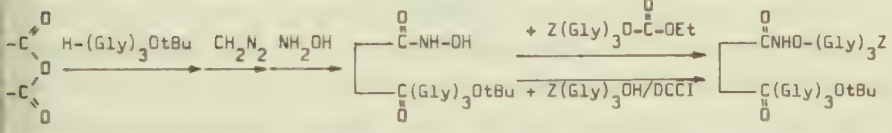
ZP 4

Es ergaben sich dabei keine besonderen Schwierigkeiten. Alle Pr dukte wurden wiederum durch IR-Spektren, die Hydroxamsäure und ZP 4 zusätzlich durch Mikroanalyse und NMR-Spektren analysiert

harakterisiert. Das IR-Spektrum des ZP 4 weist wiederum eine An-
ydrid-Kombinationsbande bei 1780 cm^{-1} auf.

.6. Synthese des ZP 5

Der Synthesegang deckt sich wiederum weitgehend mit jenem
:r ZP 1 und 4. Als Schwierigkeiten sind vor allem die geringe
slichkeit und die teilweise geringen Ausbeuten anzumerken.



ZP 5

Die tertiär-Butylester-Gruppierung schützt das Peptid vor
m Angriff des Hydroxylamins. Die O-Acylierung der Hydroxamsäure
ss, infolge deren sonst schlechten Löslichkeit, in Pyridin vor-
nommen werden. Beide Acylierungsmethoden (mit dem gemischten An-
drid bzw. mit DCCI) führen zu einem Produkt, das im IR-Spektrum
eder eine Anhydridbande bei 1790 cm^{-1} besitzt.

Das ZP 5 ist bei 20° in festem wie auch in gelöstem Zustand
scheinend stabil; insbesondere können unter diesen Bedingungen
ch nach Wochen keine Umlagerungsprodukte nachgewiesen werden.

7.7. Syntheseversuche mit ACTH-Peptidsequenzen.

Vorausgeschickt sei die Feststellung, dass man beim synthetischen Arbeiten mit diesen grossen Peptiden auf beträchtliche Schwierigkeiten stösst:

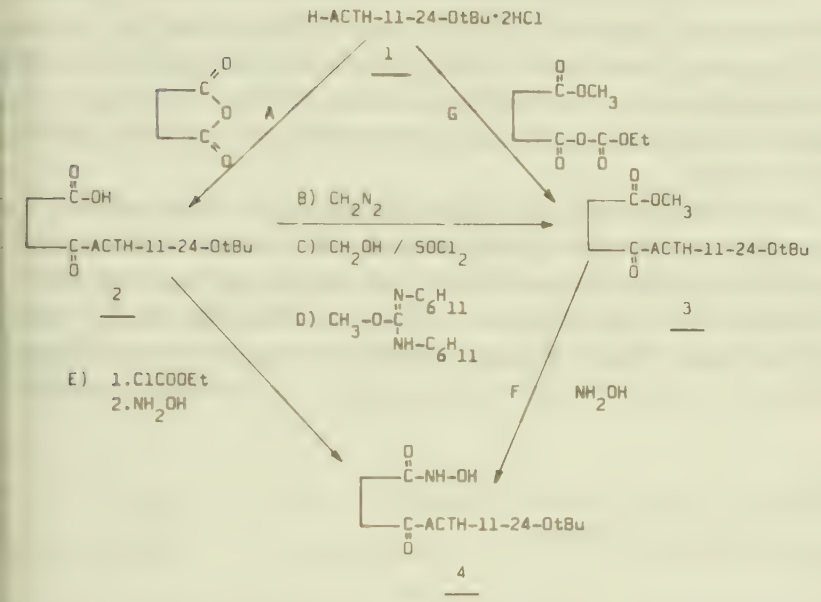
1. Ausgangsprodukte: Die beiden Peptide BOC-ACTH-1-10-OH und H-ACTH-11-24-OtBu enthalten im DC nachweisbare Begleitprodukte, die, wenn überhaupt, nur mit grossem Aufwand abgetrennt werden könnten (67). Ferner enthalten beide in ihrer Sequenz ungeschützte (bzw. nur protonierte) Argininggruppen (Guanidin-Substituent), die zu Nebenreaktionen führen können.

2. Synthese: Die Umsätze erfolgen meist mit schlechten Ausbeuten, und es treten immer Nebenreaktionen auf. Die schlechte Löslichkeit behindert die Reaktionen. Infolge der Kostbarkeit der Peptide kann nur mit kleinen Mengen gearbeitet werden.

3. Analytik: Die üblichen Analysemethoden wie NMR- und IR-Spektren, Schmelzpunkt und Elementaranalyse liefern keine brauchbaren Resultate. Beispielsweise sind die IR- und NMR-Spektren von H-ACTH-11-24-OtBu und HOOC-CH_2-CH_2-CO-ACTH-11-24-OtBu praktisch identisch. Als einzige Kontroll- und Identifizierungs-Möglichkeit bietet sich die Dünnschichtchromatographie an. Arbeitet man mit geeigneten, polaren Fliessmittelgemischen, so manifestieren sich schon geringe Aenderungen am Molekül in unterschiedlichen R_f-Werten.

4. Reinigung: Eine einfache Reinigung der Reaktionsprodukte kann meist nur durch eine mehr oder weniger selektive Fällung in verschiedenen Lösungsmitteln erzielt werden; so gelingt hauptsächlich die Abtrennung von niedermolekularen Verbindungen.

Bis zur Hydroxamsäure 4 wurden verschiedene Wege eingeschla-
en:



Alle diese Reaktionen wurden ausprobiert und dünnschicht-
romatographisch verfolgt. Einzig der Umsatz A verläuft praktisch
antitativ und ohne wahrnehmbare Nebenreaktionen. Der schon mehr-
ch beschriebene Syntheseweg A→B→F bereitet besonders bei der
esterung Schwierigkeiten: Während mit Thionylchlorid/Methanol
3, Weg C) und auch mit dem Isoharnstoff nach Vowinkel (31, Weg
überhaupt keine Reaktion zustande kommt, erfolgt der Umsatz mit
zomethan (Weg B) nur sehr langsam. Dies deutet darauf hin, dass
freie Carboxylgruppe der Bernsteinsäure in 2 beträchtlich ste-
ch gehindert ist.

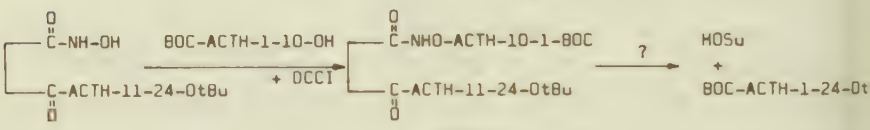
Eine bessere Ausbeute (DC) des Methylesters 3 erhält man
ch eine Kupplung des Bernsteinsäure-monomethylesters an das
tid (Weg G).

Die Reaktion des Methylesters 3 mit Hydroxylamin (Weg F) er-
gt bei 20° langsam, bei 40°wohl etwas beschleunigt, aber die

Nebenreaktionen treten auch mehr in Erscheinung. Als solche komm eine Hydroxylaminolyse des Peptids oder ein Angriff auf die Guan din-Gruppe des Arginins in Frage.

Um diese unerwünschten Reaktionen zu unterbinden wurde mit Weg E versucht, bei -10° die Säure zu aktivieren und mit Hydroxy amin umzusetzen. Man erhält dann, nach dünnschichtchromatographi schem Befund, wohl dieselbe Hydroxamsäure wie nach F, aber nur m schlechter Ausbeute, vermutlich wiederum durch die sterische Hin derung bedingt.

Die Kupplung von BOC-ACTH-1-10-OH an die Hydroxamsäure 4 müsste das ZP 6 ergeben. Wenn dieses, wie erhofft, bei Zimmer- temperatur spontan umlagern würde, so müsste man anstelle des ZP 6 gerade HOSu und BOC-ACTH-1-24-OtBu nachweisen können (das HOSu kann dank seiner starken UV-Absorption auf fluoreszierender DC-Platten schon in Mengen von etwa 1/10γ nachgewiesen werden).



ZP 6

Diese Acylierung wurde unter verschiedenen Bedingungen dur geführt und ergab immer mehrere Produkte, von denen keines siche als ZP 6 identifiziert werden konnte. In keinem Fall konnten HOS oder das gekuppelte Tetraicosa-Peptid nachgewiesen werden (auch nicht bei längerem Stehen bei 20°).

Die erhaltenen, von DCCI gereinigten Gemische wurden schli lich auf Temperaturen bis 150° erwärmt und im UV bestrahlt. Auch dabei konnten aber keine Umlagerungsprodukte aufgefunden werden.

Selbst als die Hydroxamsäure auf einer Kieselgelsäule gere nigt wurde, konnte nach einer DCCI-Kupplung mit der Peptidsäure kein Produkt gewonnen werden, das spontan oder beim Erhitzen die Umlagerung erlitten hätte.

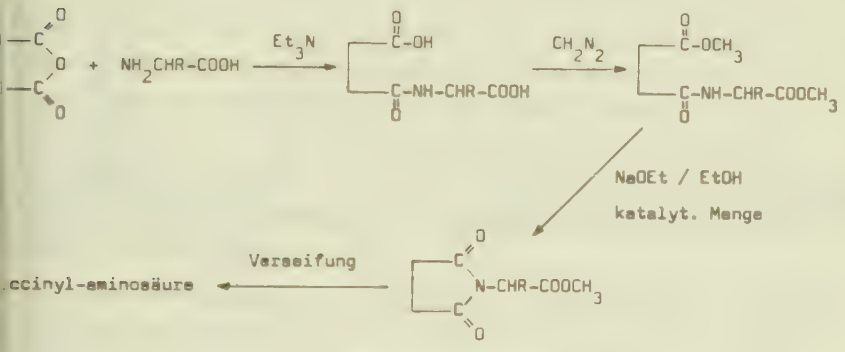
Natürlich besagt dieses Ergebnis nicht, dass die Umlagerung
nmöglich wäre. Wenn man die vier zu Beginn des Kapitels bespro-
henen Punkte bedenkt, so bieten sich verschiedene Erklärungsmög-
lichkeiten für das Ausbleiben der erwarteten Reaktion an:

- Die vielen Nebenprodukte könnten die Umlagerung behin-
ern oder mit den Umlagerungsprodukten weiterreagieren.
- Die Hydroxamsäure hat vielleicht gar nicht die erwartete
ruktur, obschon sie auf verschiedenen Wegen dargestellt wurde.

Sollten weitere Versuche dieser Art durchgeführt werden, so
ssten einige dieser Schwierigkeiten möglichst eliminiert werden.
sbesondere sollte ein grosses Peptidpaar vorliegen, das keine
geschützten, reaktiven Substituenten besitzt, das relativ gut
slich ist und bei dem ebenfalls gute Erfahrungen mit dem Wünsch-
rfahren vorlägen.

8. Succinyl-aminosäure-ester.

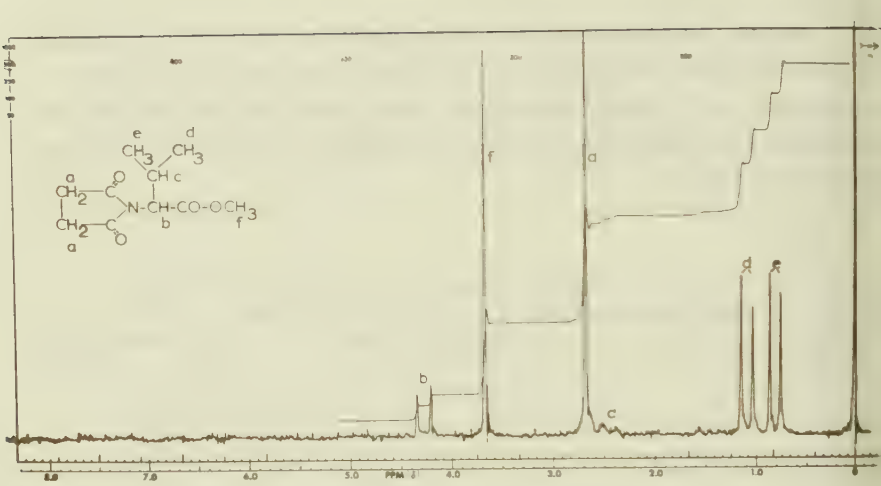
Es sei schliesslich noch kurz erwähnt, dass der im Kapitel 1. besprochene Ringschluss von Bernsteinsäure-4-benzylamid-1-thylester zu N-Benzylsuccinimid durch katalytische Mengen von koholat eine mögliche Darstellungsmethode für Succinyl-amino-uren nahelegt:

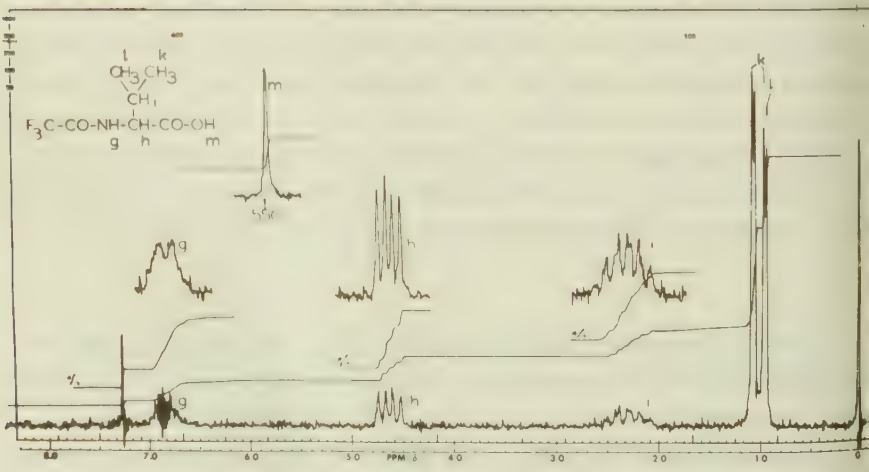


Succinyl-aminosäure-ester

Nach diesem Reaktionsschema wurden die in der Literatur nicht kannten Methylester von Succinyl-glycin und Succinyl-valin her-stellt und durch Mikroanalyse, Molekulargewicht, IR- und NMR-ktren charakterisiert. Ob die optische Aktivität dabei erhalten ibt wurde nicht abgeklärt. Ebenso wurden die Eigenschaften von cinyl-aminosäuren in dieser Arbeit nicht untersucht. Es wäre r von Interesse, einen Vergleich mit den bekannten und synthe-ch anwendbaren Phthalylaminosäuren (58) anzustellen.

Als interessante Beobachtung sei noch das NMR-Spektrum von cinyl-valin-methylester (vgl. folgende Seite) diskutiert. Es gt, wie erwartet, die Bernstein- (a) und Methylester-Protonen als Singletts (2,67 bzw. 3,67 ppm) und das α-ständige Proton als Dublett (4,27 ppm, J=8 Hz). Das zweite Methinproton (c)


e
d
CH3
CH3
a
O
CH c
CH2
C
N-CH-CO-OCH3
CH2
C
b
f
a
O
f
a
b
c
d
e
8.0
7.0
6.0
5.0
PPM δ
4.0
3.0
2.0
1.0
0


l
k
CH3
CH3
CH1
F3C-CO-NH-CH-CO-OH
g
h
m
m
g
h
i
k
l
g
h
i
8.0
7.0
6.0
5.0
PPM δ
4.0
3.0
2.0
1.0
0

kennt man hingegen praktisch nur im intergralen Spektrum in r Nähe von 2,4 ppm; für die beiden Methylgruppen d und e erheinen hingegen z w e i Dubletts mit einer relativen Verhiebung von 17 Hz.

Das NMR-Spektrum von Trifluoracetyl-L-Valin (TFA-L-Val- weist ebenfalls zwei Dubletts, aber nur mit einer relativen rschiebung von 1,5 Hz, auf.

Das spezielle Verhalten der Isopropylgruppe im NMR- ktrum wurde in der Literatur (83, dort weitere Zitate) schon ähnt. Die beiden Methylgruppen sind diastereotop, das heisst e Umgebung ist verschieden und das Molekül weist kein Symmeeelement auf, das die beiden Methylgruppen ineinander überren könnte. Im Spektrum äussert sich dies in einer Aufspaltung geminalen Methylgruppen, die also zunächst eine Folge der mmetrie der Aminosäure ist.

Die beträchtlich grössere relative Verschiebung im Falle Succinyl-valin-methylesters könnte hingegen auf die zusätzne Wirkung einer sterischen Hinderung zurückzuführen sein.

Man könnte daraus schliessen, dass im Succinyl-valinylester eine bedeutend stärkere sterische Hinderung auftritt im TFA-L-Valin. Diese Aussage kann durch Dreiding-Modelle beiden Verbindungen bestätigt werden: Die Drehbarkeit um die dung b-c ist praktisch vollständig unterbunden, während jene die Bindung h-i nur eingeschränkt ist.

Die Spin-spin-Kopplungskonstanten mit den Methingruppen bzw. (i) betragen in allen Fällen etwa 6,5 Hz. Die schlechte nnbarkeit der Methingruppe (c) wird durch ihre hohe Multiplit erklärt, die durch Kopplungen mit der α-Methin- und den beiungleichen Methylgruppen (d) und (e) hervorgerufen wird.

Die Spektren liefern folgende Werte:

Methylgruppe:	d bzw. k (ppm)	e bzw. l (ppm)	relat. Verschiebung (ppm)	(Hz)
inyl-valin-methylester	1,08	0,81	0,27	17
L-Valin	1,02	1,00	0,02	1,5

EXPERIMENTELLER TEIL

8. Verzeichnis der Abkürzungen

abs	absolut
Ac	CH_3-CO-
AcOH	CH_3-COOH etc
Ae	Aether
BOC-	tert.Butyl-oxy-carbonyl-
Chl	Chloroform
d-	Deutero-
DC	Dünnschicht-Chromatogramm bezw. -Chromatographie
DCH	Dicyclohexyl-harnstoff
DCCI	Dicyclohexyl-carbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DTA	Differentialthermoanalyse
Et	C_2H_5-
HV	Hochvakuum
Me	CH_3-
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrum
Nin	Ninhydrin
-O-tBu	-O-$C(CH_3)_3$
-OiProp	-O-$CH(CH_3)_2$
PAe	Petroläther
TFA	Trifluoracetyl-
Tol	Chlor-Tolidin
Z-	Carbobenzoxy- (Benzyl-oxy-carbonyl)
ZP	(Modell-) Zwischenprodukt
ZT	Zimmertemperatur

NMR-Spektren:

S	Singlett
D	Dublett
T	Triplett
M	allg. Multiplett, komplexes Signal

ACTH-Peptide:

BOC-ACTH-1-10-OH	BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Gly-OH
H-ACTH-11-24-OtBu	H-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lys(BOC)-Val-Pro-OtBu
Z-ACTH-11-16-OtBu	Z-Lys(BOC)-Pro-Val-Gly-Lys(BOC)-Lys-(BOC
Z-ACTH-5-7(NO_2)-10-OMe	Z-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg(NO_2)-Try-Gly-OMe
Z-ACTH-7-10-OH	Z-Phe-Arg-Try-Gly-OH

Die Aminosäurereste sind nach E.Brand, Ann.N.Y.Acad.Sci. 47 189 (1946) abgekürzt.

Allgemeines

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt
d sind unkorrigiert.

Die Elementaranalysen wurden durch das Mikrolabor der
NDOZ A.G. (Dr. Schöniger) ausgeführt.

Die IR-Spektren wurden auf einem "Infracord" und einem
R-257" Gitterspektrometer der Firma Perkin-Elmer durch Herrn
hilli und Mitarbeiter aufgenommen (SANDOZ). Die jeweils zur
bstanzcharakterisierung angeführten wichtigsten IR-Daten sind
Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Alle IR-Spektren wurden in KBr
fgenommen.

Die NMR-Spektren wurden auf einem Varian A 60 im Spektral-
bor des Instituts für organische Chemie der Universität Basel
:ch Herrn K.Aegerter aufgenommen.

Die Massenspektren (MS) gelangten auf einem CEC Massen-
:ktrometer 21-110B bei SANDOZ (Dr. K.Frei) zur Durchführung.

Die Differentialthermoanalysen (DTA) wurden auf einem von
rn K.Hofer sen. (SANDOZ) entwickelten Gerät durch Herrn Schmutz
genommen.

Allen aufgeführten Herren und ihren Mitarbeitern sei für
Entgegenkommen und die exakte Ausführung der Messungen herz-
h gedankt.

Die osmometrischen Messungen wurden mit einem thermoelek-
schen Dampfdruck-Osmometer der Firma Dr.-Ing. Herbert Knauer,
lin vorgenommen und werden noch näher erläutert (Kap.12). Von
gleichen Firma stammt das Zusatzgerät zur Kryoskopie.

Die Angaben über Dünnschichtchromatographie (DC) beziehen
n auf die Ausführungsform von M.Brenner et al (68, 69) auf
:selgel G (Merck)-Schichten unter Zusatz von Zinksilikat als
)reszenzindikator. Die meist verwendeten Fliessmittel waren
lumenverhältnisse):

A	$CHCl_3$ / THF	4 : 1
B	n-Propanol / Wasser	7 : 3
C	AcOEt/Pyridin/AcOH/H_2O	61:21:6:11 *)

Der Nachweis der Substanzflecke erfolgte mit Ninhydrin (Nin+, Nin-), Cl_2/Tolidin (Tol+ bzw. Tol-) oder unter der UV-Lampe (254) (70). Hydroxamsäuren wurden durch Besprühen mit einer 10%-igen Fe-Cl_3 - Lösung in 0,5 n-HCl spezifisch nachgewiesen (bezeichnet mit Fe-Test + bzw. -). - Es werden nur gerundete R_f-Werte aufgeführt, da ihre absolute Konstanthaltung nicht erforderlich war.

Die verwendeten Lösungsmittel waren von handelsüblicher Qualität (puriss. oder purum, Fluka AG, Buchs/CH) und sind, falls mit abs. bezeichnet, nach gängigen Methoden absolutiert worden (82). Das mit DMF* bezeichnete Dimethylformamid wurde nach einer durch E.Wünsch privat übermittelten Vorschrift aufbereitet (71).

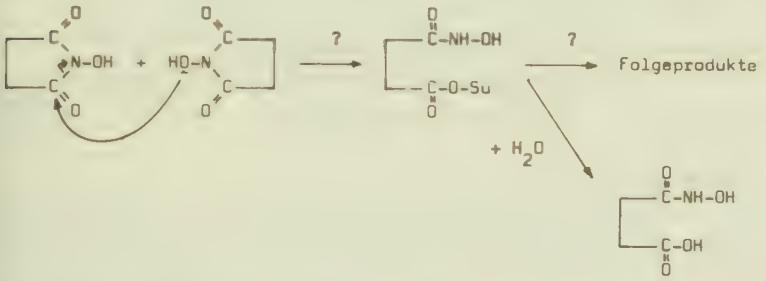
Die verschiedentlich aufgeführten ACTH-Peptidsequenzen (72) wurden uns freundlicherweise von der CIBA AG (Dr. B.Iselin) zur Verfügung gestellt und seien an dieser Stelle ebenfalls bestens verdankt.

---

*) mitgeteilt von der CIBA AG.

0. Selbstzersetzung von N-Hydroxysuccinimid.

Lagert man HOSu mit einem Schmelzpunkt von 97 - 99°C bei immertemperatur, so beobachtet man bei einer Kontrolle nach inigen Monaten einzelne Kristalle, die schon bei 45 - 50°C zu chmelzen beginnen. Nach den in den Kapiteln 3.2. und 4.3. (Hypothese 2b) gemachten Feststellungen könnte man vermuten, dass in HOSu-Molekül von einem zweiten angegriffen wird:



e aktivierte Säure könnte nun mit der Hydroxamsäuregruppe eines eiten Moleküls Folgereaktionen eingehen.

Mit Wasser entstände aus diesem ersten Nebenprodukt Bernein-monohydrosamsäure. Es ist allerdings nicht gelungen, diese rbindung im DC alter, in Wasser gelöster HOSu-Proben nachzuisen, obschon mit verschiedenen Trennmedien und Konzentrationsihen mit hohen Auftragungsmengen gearbeitet wurde.

Diese beiläufige Nebenfrage ist damit also noch nicht geirt und bedarf weiterer Abklärungen.

11. Leitfähigkeitsversuche

11.1. Ausgangsprodukte

N-Hydroxysuccinimid

Es wurde käufliches HOSu (Fluka) verwendet, das, aus Essig-ester umkristallisiert, einen Schmelzpunkt von 97 - 99° aufweist. Es muss im Kühlschrank aufbewahrt und jeweils nach 2 - 3 Monaten neu umkristallisiert werden.

N,N' Dicyclohexyl - O-äthyl-isoharnstoff

wurde nach der Methode von E. Vowinkel (31) aus abs. Aethanol DCCI und Cu_2Cl_2 als Katalysator hergestellt.

L-Valin-methylester

wurde nach der Thionylchlorid-Methode (73) aus L-Valin und dem Reagens aus Thionylchlorid und Methanol und nachfolgender Freisetzung des Esters mit Ammoniak gewonnen (genaue Vorschrift: Schwyzer und Iselin, 74)

Trifluoracetyl-L-Valin (TFA-L-Val-OH)

wurde durch Zusammenschmelzen von L-Valin mit Trifluoracetyl-phenyl-ester in Phenol hergestellt. (Vorschrift nach Weygand, 75). NMR: siehe Kapitel 7.8.

11.2. Konduktometrische Titration von N,N'-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff mit 0,5 m HOSu in THF. (vgl. Kap. 5.3.)

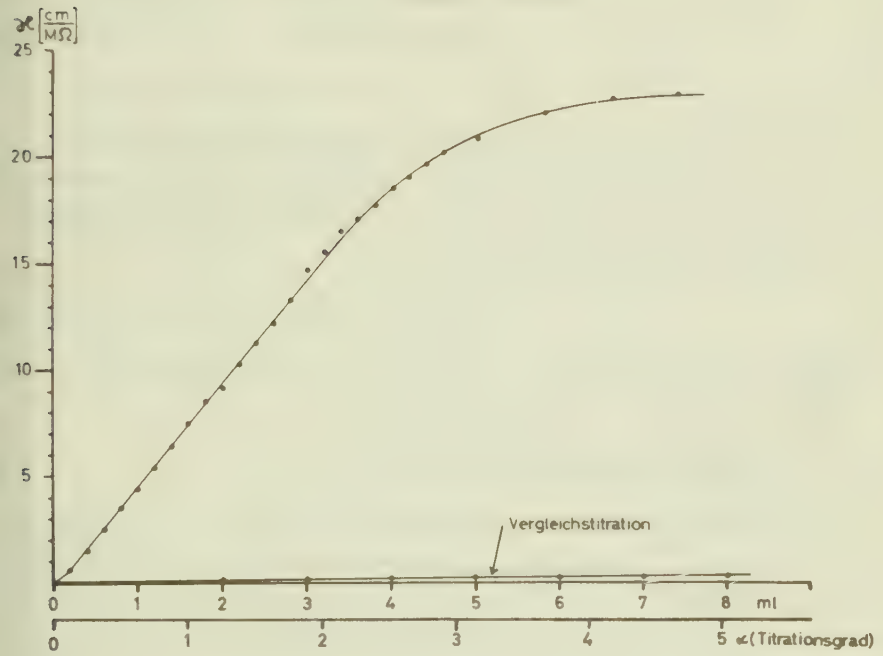
Die Messung wurde mit einer Philips-Messbrücke vom Typ GM 4 und einer Messzelle mit einer Widerstandkapazität von c = 1,32 ausgeführt.

In einem engen hohen Präparateglas (20 ml) wurden 200 mg (0,79 mMol) N,N'-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff in 3 ml THF abs. gelöst und anfänglich in 1/10 ml - Intervallen, später in grösseren mit einer 0,5 m HOSu-Lösung in THF abs. (575 mg/10 ml) titriert. Die dabei abgelesenen Widerstandswerte R wurden nach der Formel

$\varkappa = \frac{1}{\sigma} = \frac{c}{R}$ σ = spezifischer Widerstand

in die spezifische Leitfähigkeit umgerechnet. Als Vergleich wurde reines THF (3 ml) mit derselben HOSu-Lösung titriert.

Konduktometrische Titration von N,N'-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff mit 0,5 m HOSu in THF.



Verhältnis der spezifischen Leitfähigkeiten

am Aequivalenzpunkt: 58

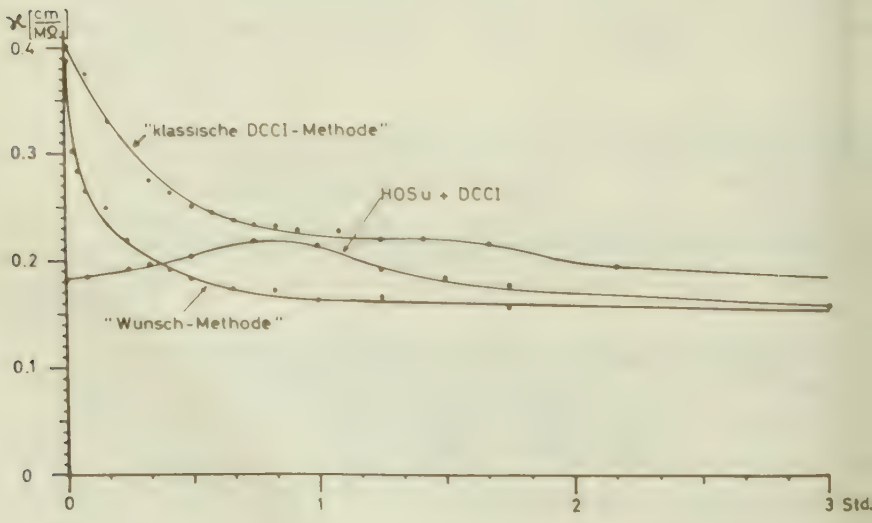
bei 4 Aequivalent: 87

11.3. Konduktometrische Verfolgung der DCCI-Kupplung von TFA-L-Val-OH mit H-L-Val-OMe und DCCI mit und ohne HOSu-Zusatz und der Reaktion von HOSu mit DCCI (vgl.Kap.3.2. und 5.3.)

Es wurden die folgenden 3 Reaktionssysteme hergestellt:

	"klassische DCCI-Kupplung"	"Wünsch-Kupplung"	HOSu + DCCI
TFA-L-Val-OH	23 mg 0,1 mMol	23 mg 0,1 mMol	-
H-L-Val-OMe	15 mg 0,1 mMol	15 mg 0,1 mMol	-
DCCI	30 mg 0,1 mMol	30 mg 0,1 mMol	120 mg 0,58 mMol
HOSu	-	23 mg 0,2 mMol	92 mg 0,80 mMol
THF	5 ml	5 ml	5 ml

Nach dem schnellen Auflösen aller Komponenten eines Ansatzes wurden zunächst in Minuten-, später in grösseren Intervallen die Leitfähigkeit bestimmt. Die Messresultate sind im folgenden Diagramm dargestellt.



Versuche zum Nachweis von Assoziaten (vgl. Kap. 5.1.)

Osmometrische Messungen

Das verwendete thermoelektrische Dampfdruckosmometer der
ma Knauer, Berlin, ist zur Bestimmung von Molekulargewichten
etwa 400 in Lösungsmitteln wie Chloroform, THF oder Benzol
r gut geeignet, wenn die untersuchten Verbindungen bis zu
zentrationen von etwa 0,05 - 0,1 m löslich sind (vgl. die An-
en bei verschiedenen Produkten im experimentellen Teil). -
höhermolekularen Stoffen, die schlecht und zudem nur in po-
en Lösungsmitteln löslich sind, treten aber die in Kapitel
. besprochenen Schwierigkeiten auf.

1. MG-Bestimmungsversuche an H-ACTH-11-24-OtBu·6H_2O·3HCl in H_2O und MeOH und an Z-ACTH-11-16OMe und Z-ACTH-5-7-(NO_2)-10-OMe in DMF

Zur Illustration einer typischen Messung seien hier die
swerte einer Serie der MG-Bestimmungen von H-ACTH-11-24OtBu·
O·3HCl in Wasser aufgeführt (Lösung 2, vgl. Kap.5.1.):

Messbedingungen: LM = H_2O, 60°C, höchste Empfindlichkeit, Ablesung nach jeweils 2 Minuten Gleichgewichtseinstellung. Als Eichstandart wurden Harnstofflösungen verwendet.

punkt vor Messreihe: enteile (Skt)	Messreihe: 58,5mg/ml H-ACTH-11-24OtBu·6H_2O·3HCl		Nullpunkt nachher: Skt
0,0	5)	+37,6	9) -1,5
+5,0	6)	+36,0	10) +3,0
+3,6	7)	+36,1	11) +7,0
+3,0	8)	+35,0	12) +7,5
11,6 : 4 = +2,9		+144,7:4 =+36,8	+19,0:4 =+4,7

Man erkennt die starke Streuung des Nullpunktes vor und nach der Messreihe wie auch der eigentlichen Messwerte.

Als Mittelwert des Nullpunkts erhält man: $\bar{N} = \frac{+2,9 \; +4,7}{2} = +3,8$

Als Mittelwert der Messung demnach: $\bar{M} = 36,8 - 3,8 = +33,0$ Skt

Diese 33,0 Skt entsprechen nach der Eichkurve für wässrige Lösungen einer Molarität von 0,054Mol/ltr. Also:

$$MG = \frac{58,5 \text{ mg}}{1\text{ml} \cdot 0,054\text{Mol/l}} = 1085 \; \frac{g}{\text{Mol}}$$

Für die Messung des H-ACTH-11-24 OtBu·$6H_2O$·3HCl in einer 1 m Harnstofflösung gelten die gleichen Bemerkungen, wie sie im Abschnitt 12.3. über das Arbeiten mit Lösungen als Lösungsmittel gemacht werden.

Messungen in DMF sind dadurch erschwert, dass einerseits bei 90° gearbeitet werden muss und andrerseits die zur Gleichgewichtseinstellung benötigte Zeit dennoch 10 Minuten (gegenüber 2-3 Minuten bei den anderen LM) beträgt. Beide Faktoren wirken sich im schlechten Sinn auf die Nullpunkts- und Messwert-Schwankungen aus. Die Messempfindlichkeit und auch die Streuung liegen etwa zwischen den Werten für Messungen in Wasser bzw. in Methanol. Verwendet man statt des gewöhnlich destillierten DMF's ein nach Wünsch aufbereitetes DMF*, so findet man keinen wesentlichen Unterschied in den Resultaten und Streuungen.

Die kryoskopischen Nachprüfungen der wässrigen Lösungen erfolgte mit dem Zusatzgerät zum Messteil des Dampfdruckosmometers. Als Eichsubstanz diente ebenfalls Harnstoff.

Die Messresultate und -Bedingungen seien hier tabellarisch zusammengestellt:

ptid	LM	Konzentration	Temp.	MG-osmom.	MG-kryosk.	MG-berech.
ACTH-11-24	MeOH	50,2 mg/ml	45°	770		2326
$6H_2O \cdot 3HCl$	H_2O	43,5 mg/ml	60°	870	590	2326
	H_2O	58,5 mg/ml	60°	1085	695	2326
	H_2O	37,2 mg/ml	60°	735		2326
1mHarnst.	in H_2O	47,9 mg/ml	60°	840		2326
ACTH-11-6-OMe	DMF	38,4 mg/ml	90°	915		1104
	DMF	61,8 mg/ml	90°	895		1104
	DMF*	35,9 mg/ml	90°	875		1104
1)	DMF*	36,8 mg/ml	90°	896		1104
2)	DMF*	26,8 mg/ml	90°	905		1105
ACTH-5-7 O_2)-10-OMe	DMF*	20,6 mg/ml	90°	735		1035

1) Peptid am HV 24 h bei 40° getrocknet

2) Peptid (0,5 gr) auf 100 gr Kiselgel-Säule gegeben, mit Cl_3/MeOH Mischungen mit zunehmendem MeOH-Anteil eluiert und HV getrocknet.

2. Viskositätsmessungen an wässrigen Lösungen von H-ACTH-11-24-OtBu

Als Messgerät diente ein Ostwald-Viskosimeter in einem 1/10° konstant gehaltenen Wasserbad. Zur Ermittlung der absoen Viskosität wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\eta_{abs} = \varrho(A \cdot t - \frac{B}{t}) \quad [cP]$$

η_{abs} = absolute Viskosität
ϱ = Dichte der Lösung
A,B = Hagenbach-Konstanten
t = gemessene Durchlaufzeit
cP = centi-Poise

Hilfe von Aether und Wasser als Eichlösungsmittel wurden die enbach-Konstanten wie folgt ermittelt:

$$A = 0{,}00693 \quad \frac{cm^3}{gr \cdot sec} \cdot cP$$

$$B = 0{,}852 \quad \frac{cm^3}{gr} \cdot cP$$

Die Dichten der Lösungen wurden mit einem 1 ml-Pyknometer bestimmt. Die Messdaten wurden nach der obigen sowie nach den folgenden Definitions-Gleichungen in Viskositätszahlen (" intrinsic viscosity ") umgerechnet:

relative Viskosität: $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$ $\eta_0 = \eta_{abs}$ des reinen LM

spezifische Viscosität: $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$ [dimensionslos]

konzentrationsabhängige Viskositätszahl: ("intrinsic viscosity") $[\eta] = \frac{\eta_{sp}}{c}$ c = Konzentration $\left[\frac{gr}{ml}\right]$

Viskositätszahl: $Z = \lim_{c \to 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$

Tabelle der Viskositätszahlen im Vergleich zu osmometrischen Parallelbestimmungen

Verbindung	Konz. $\left[\frac{mg}{ml}\right]$	$\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot 10^2$ T = 25°	$\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot 10^2$ T = 40°	$\frac{\eta_{sp}}{c} \cdot 10^2$ T = 60°	os me MG T
H-ACTH 11-24-OtBu·3HCl·6H_2O	20,0	0,50	0,42	0,53	
" "	37,2	0,59	0,52	0,57	7
"	70,0	0,800	0,745	0,762	10
"	93,0	0,957	0,956	0,948	1
Harnstoff	96,1	0,090			
"	192,3	0,094			
"	336,5	0,11			
"	480,5	0,15			

Eine graphische Darstellung dieser Messwerte findet sich im Kapitel 5.1.

Bei der Subtraktion von 1 bei der Berechnung von η_{sp} ird der Fehler der Werte $\frac{\eta_{sp}}{c}$ bei den kleinen Konzentrationen da dann η_{rel} nur wenig über 1) grösser (ca $\pm$ 15%) als bei den rossen Konzentrationen (ca $\pm$ 5%). Demnach ist eine Temperatur- bhängigkeit innerhalb der Fehlergrenzen nicht festzustellen vgl. Diagramm Kap. 5.1.) und die Extrapolation der Werte auf = O ergibt für alle Temperaturen eine Viskositätszahl von

$$Z \cong 0{,}0034 \ \frac{ltr}{gr} \quad (\pm 15\%)$$

Die osmometrischen MG-Bestimmungen wurden mit den zur skosimetrie eingesetzten Lösungen im thermoelektrischen Osmo- ter ausgeführt, wobei auf eine besonders gute Temperaturkon- anz geachtet wurde. Die absoluten Werte sind aus den im Kapitel 1. besprochenen Gründen bedeutend zu klein. (MG ber. = 2326).

.3. Osmometrische Differenzmessungen im System Z-ACTH-7-10-OH / H-Met-OiProp / HOSu (vgl. Kap. 5.1.)

Es ist möglich, im thermoelektrischen Osmometer mit Lö- ngen anstelle von Lösungsmitteln zu arbeiten. Zur Nullpunktsein- ellung wird dementsprechend an beide Thermistoren ein Lösungs- opfen angehängt und das Gleichgewicht abgewartet. Zur Messung rd die zu untersuchende Verbindung in der L ö s u n g gelöst i damit der eine Mess-Thermistor benetzt; der Referenz-Thermi- or erhält einen Tropfen der reinen Lösung. Dabei ist zu beach- n, dass bei höheren Konzentrationen (z.B. 1 m-Harnstoff in Was- r) eine längere Zeit zur Gleichgewichtseinstellung benötigt rd und gleichzeitig die Reproduzierbarkeit schlechter wird. eser Effekt dürfte hauptsächlich auf die systematische Abhän- gkeit der Messanzeige von der Tropfengrösse (nur bei der Ver- ndung konzentrierter Lösungen als LM) zurückzuführen sein. Das

folgende Beispiel der Nullspunkts-Abhängigkeit bei reinem Wasser und bei einer wässrigen 1 m-Harnstofflösung von der Tropfengrösse soll dies verdeutlichen:

a) an beiden Thermistoren H_2O-Tropfen: (Tr = Tropfen)

Mess-Thermistor	Referenz-Thermistor	Nullpunkts-Mittel aus 4 Messungen:
mittlerer Tr	mittlerer Tr	-1,3 Skt
kleiner Tr	grosser Tr	-0,8 Skt
grosser Tr	kleiner Tr	+1,8 Skt

b) an beiden Thermistoren Tropfen von 1 m-Harnstoff/H_2O:

mittlerer Tr	mittlerer Tr	-2,8 Skt
kleiner Tr	grosser Tr	-9,7 Skt
grosser Tr	kleiner Tr	+9,6 Skt

Bei der Verwendung von Lösungen als Lösungsmittel muss also auf eine möglichst konstante Tropfengrösse innerhalb einer Versuchsreihe geachtet werden. Ferner muss für jede Lösung, die als LM eingesetzt wird, mit mehreren verschiedenen Eichsubstanzen eine Eichkurve erstellt werden.

Für die hier zitierten Messungen wurden folgende Eichsubstanzen verwendet: Phenylbenzoat, N-Butylcarbazol und Phenanthren. Azobenzol, Harnstoff und Benzil wurden zu Vergleichszwecken ebenfalls geprüft, gaben aber oft keine übereinstimmenden Resultate, da sie offenbar, je nach Milieu, selbst assozieren können.

Die Resultate dieser Differenzmessungen sind in der Tabelle Seite 34 aufgeführt. Als "Lösungsmittel" wurden verwendet:

DMF*	nach Wünsch (71) gereinigtes DMF
HOSu-DMF*	127 mg/10ml HOSu in DMF*
MiP-DMF*	198 mg/25 ml H-Met-OiProp in DMF*

TH-DMF*	751 mg/25 ml Z-ACTH-7-10-OH in DMF*
Su-MiP-DMF*	235 mg HOSu + 204 mg H-Met-OiProp / 25 ml in DMF*
Su-ACTH-DMF*	235 mg HOSu + 751 mg Z-ACTH-7-10-OH / 25 ml in DMF*
P-ACTH-DMF*	80,9 mg H-Met-OiProp + 300mg Z-ACTH-7-10-OH/ 25 ml in DMF*

Mit diesen "Lösungsmitteln" wurde jeweils durch Zugabe ıer der zu untersuchenden andern Komponenten eine Messlösung gestellt, bei der immer ein Aequivalenzverhältnis

Z-ACTH-7-10-OH : H-Met-OiProp : HOSu : DMF von 1 : 1 : 2 : 310

gehalten wurde. Ferner wurde mit den oben zitierten Verbindun- für jedes "Lösungsmittel" eine Eichkurve erstellt, wobei jene Verbindungen Verwendung fanden, mit denen die beste Uebereinmmung erzielt wurde. Danach wurden die in der Tabelle Seite 34 egebenen Werte berechnet.

13. Das Reaktionsprodukt aus HOSu und DCCI (vgl. Kap.3.2.)

(Succinimido-oxycarbonyl-β-alanin-hydroxysuccinimidester)

Man löst 9,3 gr (81 mMol) HOSu und 18,3 gr (89 mMol) DCC in 150 ml THF abs. und kocht am Rückfluss. Nach 5 Minuten beginnt eine Kristallisation von DCH und Endprodukt. Nach 150 Minuten nutscht man den Niederschlag ab, engt die Mutterlauge ein, kühlt und filtriert nochmals. Die vereinigten Niederschläge werden 20 Minuten lang in 200 ml THF abs. ausgekocht und schnell heiss filtriert. Das Filtrat liefert nach dem Einengen und Kühlen einen Niederschlag von etwa 6,5 gr, der neben dem Produkt noch etwas DCH enthält. Der DCH kann daraus durch 4-tägiges Extrahieren des Niederschlags mit Cyclohexan in einem Soxhlet entfernt werden. (Der Inhalt der Hülse muss täglich einmal in einer Reibschale gut vermischt werden.) Wenn der Extraktionsrückstand DCH-frei ist wird er aus THF abs. umkristallisiert.

Ausbeute: 3,05 gr (46%)

DC: (A) eigentümlicherweise deckt sich der im UV sichtbare Fleck nie ganz mit dem durch Cl_2/Tolidin anfärbbaren Fleck.

Smp: 172 - 174° (H.Gross(46): 156 - 163°)

MG (osmometr. in THF) = 348 MG (ber.) = 327

Analyse:	gef.	44,5% C	4,3% H	13,0% N	36,8% O
	ber.	44,1	4,01	12,8	39,2

IR: siehe Kap. 3.2.

NMR: siehe Kap. 3.2.

MS: siehe Kap. 3.2.

Stöchiometrie der Reaktion

Lässt man HOSu und DCCI im Aequivalenzverhältnis 1 : 1 oder 2 : 1 reagieren, so verschwindet im DC (A) der DCCI-Fleck nicht; im Verhältnis 3 : 1 hingegen verschwindet er nach 48 Stunden bei ZT praktisch vollständig und der filtrierte Niederschlag (DCH + Produkt) hat das Gewicht der eingesetzten Ausgangsverbindungen.

Ausschluss der Kupplungsfähigkeit von Succinimido-oxycarbonyl-β-alanin-hydroxysuccinimidester.

Lässt man 1 Aequivalent Su-O-CO-β-Ala-O-Su mit je Aequivalent Benzoesäure und Anilin oder mit je 1 Aequivalent FA-Val-OH und H-Val-OMe in THF abs. bei ZT reagieren, so findet an im DC (A) nach 27 bzw. 70 Stunden:

- k e i n Kupplungsprodukt (Benzanilid bzw. TFA-Val--Val-OMe)
- unveränderte Säure
- die Base reagiert mit dem Su-O-CO-β-Ala-OSu
- dabei entsteht HOSu.

14. Das Gleichgewicht zwischen HOSu und Benzylamin

(vgl. Kap. 5.4.).

a) Man löst 115 mg (1mMol) HOSu und 110 µl (1mMol) Benzylamin in 1 ml THF und lässt bei ZT stehen. Verfolgt man die Reaktion anhand des DC, so kann man erstmals nach einer Stunde einen deutlichen, nach 144 Stunden einen sehr starken Fleck vom gleichen R_f wie Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure nachweisen. Nach dem Eindampfen des Ansatzes können durch Kristallisation aus EtOH/Ae zunächst 40 mg einer Verbindung vom Schmelzpunkt 118 - 130° mit negativem Fe-Test gewonnen werden (vermutlich das Salz aus HOSu und Benzylamin). Beim weiteren Einengen der Mutterlauge erhält man schliesslich eine kristalline Fraktion von 12 mg, die nach dem Umkristallisieren aus EtOH/Ae identische Eigenschaften zu einem Referenzpräparat von Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure (siehe Kap. 16.1.5.) aufweist.
DC: (B) identische R_f (0,6), Fe-Test +
Smp: 143 - 147°
IR: identisch zu jenem des Referenzpräparates

b) Lässt man Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure in THF bei ZT stehen, so lassen sich nach etwa einem Monat im DC Spuren von HOSu und Benzylamin nachweisen.

c) Bezüglich der Verhältnisse bei HOPhth vergleiche Kapitel 7.4. und 16.6.1.

6. Vorversuche zur O^{18}-Markierung von BOC-ACTH-1-10-OH

(vgl. Kap. 5.2.)

Aktiviert man eine Carbonsäure mit Chlorameisensäure-äthylester und fügt wieder Wasser hinzu, so erhält man das Ausgangsprodukt zurück.

Mit dem Peptid BOC-ACTH-1-10-OH (MG = 1509) wurden die folgenden Versuche unternommen: 75 mg (0,05 mMol) des Peptides wurden in 2,5 ml DMF* abs. gelöst und bei -10° mit 4,7 µl (0,05 mMol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt. Nach jeweils 5 Minuten wurde Wasser, z.T. im Gemisch mit Basen, zugesetzt. Nach 2 - 5 Stunden zeigt das DC das folgende Bild:

Zusatz:	DC - Befund im Fliessmittel C bei R_f=0,2 = Ausgangsprodukt	 bei R_f=0,35 = Nebenprodukt
1 Aequivalent H_2O	10 %	90 %
" H_2O	10-20 %	80 - 90 %
10 " H_2O	10-20 %	80 - 90 %
" H_2O + 1 Aeq. Bu_3N	30-40 %	60 - 70 %
" H_2O + 5 Aeq. Pyrid.	30-40 %	60 - 70 %
" einer 10%-igen Sodalösung:		
nach 10 Min.	40 %	50 % + 3 Nebenprod.
30 Min.	50 %	40 % "
60 Min.	60 %	30 % "
120 STd.	80-90 %	0 % "

Das offensichtlich unerwünschte Nebenprodukt bei R_f = 0,35 entsteht unter allen schonenden Bedingungen. Es wurd nicht näher untersucht.

16. Synthese der Modellzwischenprodukte

16.1. Synthese von ZP 1. (vgl. Kap. 7.1.)

16.1.1. Bernsteinsäure-monobenzylamid

Man löst 4,58 gr (0,047 mMol) Bernsteinsäureanhydrid unter Rühren in 50 ml Chl. abs. und fügt 5,0 ml (0,047 mMol) Benzylamin zu. Nach einigen Sekunden erwärmt sich die Lösung etwas und nach dem Abkühlen, ev. auch spontan, fällt das Halbamid in dicken Flocken aus.

Ausbeute: 9,0 gr (95%)
DC: (A) einheitlich
Smp: 136-138°
MG (osmometr.) = 207 MG (ber.) = 207
IR: 690, 1195, 1320, 1430, 1540, 1640, 1680, 3300

16.1.2. Bernstein-4-benzylamid-1-methylester

2 gr (9,7 mMol) Bernsteinsäure-monobenzylamid werden in 4 ml Methanol gelöst und bei ZT mit einer frisch zubereiteten Lösung von Diazomethan in Aether (Vogel, Practical org. Chemistry Longmans) portionenweise versetzt, bis die Lösung schwach gelb bleibt. Nach einstündigem Rühren wird der Ansatz mit einem sehr kleinen Tropfen AcOH entfärbt und eingedampft. Das zurückbleibende Oel kristallisiert auf Kratzen mit dem Glasstab. Das Produkt wird aus Ae/PAe umkristallisiert.

Ausbeute: 1,8 gr (85 %)
DC: (A) einheitlich
Smp: 64-66°
MG (osmometr.) = 216 MG (ber.) = 221
IR: 700, 1165, 1330, 1430, 1450, 1540, 1640, 1740, 3300
NMR: (d-DMSO), 2,48ppm T, 3,54 S, 4,25 D, 7,22 S, 8,25 breit

5.1.3. N-Benzylsuccinimid (Vorversuche)

a) Es wurde nach üblicher Methodik eine Lösung von Hydroxylamin in Aethanol hergestellt durch den Umsatz von 1,0 gr 14 mMol) Hydroxylaminhydrochlorid mit 295 mg (13 mMol) Natrium als Aethylat in Alkohol) und Abfiltrieren des ausgefallenen ochsalzes.

Werden 490 mg (2,4 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-methylster mit 78 mg (2,4 mMol) dieser alkoholischen Hydroxylaminösung versetzt, so kristallisiert sehr schnell N-Benzylsuccinimid aus und nicht eine Hydroxamsäure.

usbeute: 302 mg (73 %)

C: (A) einheitlich. Nin.- , Tol.- , als weisser Fleck sichtbar. schwach UV-aktiv.

mp: 103-104° (Lit.Smp: 103°)

e-Test: -

nalyse: gef. 69,4% C - 5,6% H - 7,3% N - 18,0% O
ber. 69,8 5,8 7,4 17,0

R: 690, 720, 815, 920, 1160, 1330, 1400, 1420, 1700, 1770

b) Man löst 50 mg (0,23 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-ethylester in 1 ml Aethanol und fügt einen kleinen Tropfen (ca 10 µl) einer Natriumäthylat-Lösung (2,15 gr Na in 40 ml EtOH abs.) hinzu. Die beim Einengen kristallisierende Verbindung ist wiederum N-Benzylsuccinimid.

mp: 100-104°

t: wie unter a)

.1.4. Freisetzen von Hydroxylamin aus dem Hydrochlorid, nach Lechner und Hoffmann (57), modifiziert.

In einem Sulfierkolben mit guter Rührvorrichtung werden ,7 gr (0,5 mMol) Hydroxylamin-hydrochlorid in 50 ml EtOH abs. spendiert und mit etwa 10 mg Phenolphthalein versetzt. Unter tensiver Rührung wird eine Alkoholat-Lösung von 11,5 gr (0,5 mMol)

Natrium in 200 ml EtOH abs. so zugetropft, dass sich die Reaktionslösung nie ganz rot färbt. Mit zunehmendem Volumen können zur Unterstützung der Durchmischung kleine Glaskugeln hinzugefügt werden (sonst kann das ausfallende Kochsalz zu einer festen Masse verkleben). Bleibt die Reaktionslösung auf Zusatz eines Alkoholattropfens länger als etwa 15 Sekunden ganz rot, so wird die Reagenszugabe eingestellt und der Ansatz noch 1 - 2 Stunden gerührt. In einer Glove-Box (Feuchtigkeitsgehalt 5%, KOH-Perlen zur CO_2-Absorption) wird das Kochsalz abgenutscht und das Filtrat anschliessend in eine Tiefkühltruhe (-30°) gestellt. Bildet sich nach 2 - 3 Stunden ein feiner Niederschlag (NaCl), so wird er nochmals abfiltriert. Nach 12 - 24 Stunden bei -30° bilden sich in der Lösung lange, nadelige Kristalle von freiem Hydroxylamin, die in der Glove-Box schnell abgenutscht und in einem tarierten Kolben im Exsiccator eine Stunde lang im Vakuum getrocknet werden. Im verschlossenen Kolben kann anschliessend die Ausbeute näherungsweise bestimmt werden (zB. 12 gr, kann aber stark variieren, enthält auch noch EtOH im Kristall). Durch Eindampfen der Mutterlauge und Ausfrieren bei -30° kann die Ausbeute verbessert werden.

Die NH_2OH-Kristalle müssen möglichst rasch in MeOH, EtOH oder MeOH/tert.Butanol gelöst und im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden. Falls erforderlich, kann das freie Hydroxylamin auch ein zweites mal aus EtOH abs. umkristallisiert werden. Man erhält so ein Kochsalz- und Alkoholat-freies Produkt.

16.1.5. Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure

Man versetzt 1,81 gr (8,2 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-methylester mit etwa 5 Aequivalent = 1,23 gr (41 mMol) freiem Hydroxylamin in etwa 3 ml MeOH aus einer Stammlösung, die nach obiger Methode hergestellt wurde, verschliesst den Reaktionskolben dicht mit einem Glasstopfen und lässt bei 40° reagieren. Nach 48 - 72 Stunden (je nach DC-Befund) wird die Lösung auf -10° gekühlt und die kristallisierende Verbindung abfiltriert. Aus der

Mutterlauge können noch ein bis zwei Fraktionen gewonnen werden.
Das Rohprodukt wird aus MeOH/Ae umkristallisiert.
Rohausbeute: 1,27 gr (70 %), Umkristallisiert: 800 mg (44 %)
DC: Fe-Test +, einheitlich.
Smp: 143 - 147°
Analyse: gef. 59,3% C - 6,3% H - 21,4% O -
ber. 59,5 6,3 21,6
IR: 695, 750, 1440, 1455, 1545, 1640, 3330, um 3300 breit
NMR: (d-DMSO) 2,24 ppm M, 4,22 D, 7,20 S, 8,21 T breit

16.1.6. Bernstein-4-benzylamid-1-(O-acetyl-)-hydroxamsäure = ZP 1

a) Acetylierung mit Acetanhydrid

193 mg (0,87 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure werden bei ZT in 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Nach einer Stunde dampft man im Vakuum das Reagens ab, fügt mehrmals THF abs. hinzu und dampft wieder ein. Nach dem warmen Lösen des meist kristallinen Rückstandes in THF abs. und Umkristallisieren aus THF/PAe (10:1) erhält man das acetylierte Produkt. Es muss im Tiefkühlschrank und trocken aufbewahrt werden.
Ausbeute: 150 mg (65 %)
DC: zersetzt sich in H_2O-haltigen Gemischen. In A: einheitlich, Fe-Test -
Smp: 167 - 169°
MG (osmometr.) = 268, MG (ber.) = 264
Analyse: gef. 59,4% C - 6,1% H - 10,9% N - 24,7% O
ber. 59,1 6,06 10,6 24,3
IR: siehe Kap. 18
NMR: (d-DMSO) siehe Kap. 18
DTA: siehe Kap. 18

b) Acetylierung mit Essigsäure und DCCI

49 mg (0,22 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure, 5 mg (0,22 mMol) DCCI und 26 mg (0,22 mMol) Essigsäure werden in 1 ml Chl abs. gelöst. Nach 2 Stunden bei ZT beginnt DCH auszufallen; er wird nach 10 Stunden abfiltriert. Aus der Reaktions-

lösung können durch vorsichtige Zugabe von etwas PAe und Kühlen Kristalle erhalten werden.
Ausbeute: 30 mg (50 %)
DC: Hauptfleck wie unter a) . ein unbekanntes Nebenprodukt
Smp: 158 - 165°
IR: praktisch identisch mit jenem von a).

c) Acetylierung mit gemischtem Anhydrid von AcOH

Zu einer Lösung von 272 µl (4,75 mMol) Essigsäure und 700 µl (0,5 mMol) Triäthylamin abs. wird bei - 10° 450 µl (4,75 mMol) Chlorameisensäureäthylester dosiert (Megnetrührer). Nach 5 Minuten wird dazu eine vorgekühlte Lösung von 1,06 gr (4,75 mMol) Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure und 700 µl (0,5 mMol) Triäthylamin abs. in THF abs. getropft. Man rührt noch 2 Stunden bei -10° und lässt dann auf ZT ansteigen. Der Niederschlag wird abfiltriert (1,5 gr), mehrmals mit 40 - 50° warmem THF abs. extrahiert und wiederholt filtriert. Die vereinigten THF-Mutterlaugen werden eingeengt und gekühlt. Es kristallisiert daraus das Endprodukt, das nochmals aus THF abs. umkristallisiert wird.
Ausbeute: 900 mg (72 %)
DC: einheitlich, gleicher R_f wie die Produkte aus a) und b).
Smp: 174 - 176°
IR: identisch zu a)

16.2. Succinyl-aminosäure-ester (vgl. Kap. 7.8.)

16.2.1. Succinyl-glycin-mehtylester

1) [3-(hydroxycarbonyl-)-propionyl-]-glycin-methylester

2 gr (20 mMol) Bernsteinsäureanhydrid und 1,5 gr (20 mMol) Glycin werden in 25 ml Triäthylamin abs. und 20 ml Chl abs. 3 Stunden bei ZT gerührt. Die Lösung erwärmt sich dabei auf etwa 40°. Der Ansatz wird eingedampft, in 20 ml H_2O aufgenommen, filtriert und auf eine 20 gr Amberlite IR-120-Säule

n der H-Form gegeben. Man eluiert mit Wasser und dampft ein.
er Rückstand wird aus Alkohol/Aether umkristallisiert.
usbeute: 700 mg (20 %)
mp: 150 - 152°
R: 1240, 1400, 1550, 1645, 1700, 3320

2) [3-(Methoxycarbonyl-)-propionyl-]-glycin-methylester

400 mg (2,3 mMol) des Produkts aus 1) werden in 2 ml ethanol gelöst und bei ZT mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt, bis die Reaktionslösung schwach gelb bleibt. Nach em Eindampfen kristallisiert der Rückstand spontan.
usbeute: 415 mg (90 %)
mp: 82 - 84°
R: 1165, 1210, 1240, 1370, 1415, 1435, 1560, 1650, 1730, 1750, 3300

3) Succinyl-glycin-methylester

100 mg (0,49 mMol) des Methylesters aus 2) werden in ml Methanol gelöst und bei ZT mit einem kleinen Tropfen (ca.) µl) einer Alkoholatlösung (1,8 gr Na in 30 ml Methanol) veretzt und 12 Stunden stehen gelassen. Der nach dem Eindampfen ristallisierende Rückstand wird in warmem Aether aufgenommen, rm vom unlöslichen Teil filtriert, eingeengt und gekühlt. Das ccinyl-glycin kristallisiert in Nadeln.
sbeute: 80 mg (94 %)
p: 93 - 94°
(osmometr.) = 170, MG (ber.) = 171
alyse: gef. 49,5% C - 5,4% H - 8,1% N - 38,2% O
ber. 49,2 5,25 8,18 37,4
: 820, 910, 1060, 1175, 1225, 1260, 1325, 1375, 1420, 1710, 1750, 2950
R: 2,77 ppm S, 3,77 S, 4,13 S

16.2.2. Succinyl-L-valin-methylester

1) [3-(Hydroxycarbonyl-)-propionyl-]-L-valin

Man rührt 620 mg (6,2 mMol) Bernsteinsäureanhydrid und 810 mg (6,2 mMol) freien Valinmethylester (siehe Kap. 11.1.) bei ZT 4 Stunden lang und erhält nach dem Eindampfen ein farbloses Oel. Dieses wird direkt für die folgende Stufe weiterverwendet.

Rohausbeute: 1,4 gr

2) [3-(Methoxycarbonyl-)-propionyl-]-L-valin-methylester

Das Rohprodukt aus 1) wird in 1 ml MeOH bei ZT bis zur schwachen Gelbfärbung mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt. Nach einer Stunde wird eingedampft und es bleibt ein farbloses Oel zurück, das ebenfalls in dieser Form weiterverarbeitet wird.

Rohausbeute: 1,5 gr

3) Succinyl-valin-methylester

690 mg des aus 2) gewonnenen Produkts werden in 10 ml Aether gelöst und mit einem kleinen Tropfen Alkoholat-Lösung (1,8 gr Na in 30 ml MeOH) versetzt. Man lässt etwa 12 Stunden bei ZT stehen und gewinnt durch Zusatz von etwas PAe und durch Kühlen Kristalle vom Smp 90 - 98°. Nach einer Umkristallisation aus Ae/PAe erhält man Nadeln.

Ausbeute: 210 mg (32 %)

Smp: 96 - 98°

MG (osmometr.) = 206, MG (ber.) = 213

IR: im Fingerprint 625 - 1460; insgesamt 23 scharfe Banden, 1700, 1750, 1770, 2950/70

NMR: siehe Kap. 18.

6.3. Synthese des ZP 2 (vgl. Kap. 7.2.)

6.3.1. Saures Kaliumsalz der Acethydroxamsäure ($C_4H_9N_2O_4K$)

Bei ZT löst man 46,7 gr (0,67 Mol) Hydroxylamin-hydro-
hlorid in 240 ml Methanol und fügt unter Rühren 56,1 gr KOH
nd 29 gr (32 ml, 0,33 Mol) Essigester hinzu. Nach etwa 2 Stun-
en nutscht man das ausgefallene Kochsalz ab und lässt die Re-
ktionslösung bei ZT stehen. Nach 24 Stunden wird der Ansatz
ei 40° am Rotationsverdampfer (Vakuum) eingedampft bis ein
el zurückbleibt. In einem Langhals-Kolben wird dieses im Ex-
iccator über P_2O_5 evakuiert, bis eine zunächst starke Blasen-
ildung vom überschüssigen Hydroxylamin allmählich nachlässt.
eim weiteren Stehen im evakuierten Exsiccator setzt im Oel die
ristallisation ein. Nach etwa 12 Stunden werden dem Kristall-
rei 100 ml n-Butanol zugesetzt, die Suspension in Eis gekühlt
nd abgenutscht. Die nadeligen Kristalle werden mit etwas kal-
em n-Butanol gewaschen und aus 150 ml EtOH und 50 ml MeOH um-
ristallisiert.

sbeute: 12 gr (39 %)

-Test: +, K-Flammenfärbung

p: 152 - 154°

tration mit n/10 - HCl: MG (Titration) = 190 MG (ber.) = 188

alyse: gef. 26,1% C - 4,7% H - 15,5% N - 20,9% K

ber. 25,6 4,8 14,9 20,8

: 640, 985, 1100, 1315, 1370, 1450, 1545, 1640 breit, 3040, 3210

.3.2. Freisetzen der wasserfreien Acethydroxamsäure aus dem sauren Kaliumsalz mit Weinsäure

750 mg (4 mMol) des sauren Kaliumsalzes der Acethydro-
nsäure und 600 mg (4 mMol) Weinsäure werden 2 Stunden bei ZT
20 ml EtOH abs. gerührt. Der zurückbleibende Niederschlag
e-Test -) wird abfiltriert, der Ansatz eingedampft, nochmals
4 ml EtOH abs. aufgenommen, filtriert und zur Trockne einge-
ipft. Im Exsiccator über P_2O_5 erhält man eine kristalline Mas-

se, die, als hygroskopische Verbindung, im Exsiccator aufbewahrt wird.

Ausbeute: 585 mg (97 %)

Fe-Test +

Analyse: gef. 31,9% C - 6,7% H - 18,3% N

ber. 32,0 6,66 18,7

Smp: 80 - 88° Lit: 87 - 88°

16.3.3. O-[N'-(Benzylamido)-bernstein-]-acethydroxamsäure = ZP 2

a) mit dem sauren Kaliumsalz der Acethydroxamsäure

3 gr (13,5 mMol) Bernsteinsäure-monobenzylamid und 1,88 ml (13,5 mMol) Triäthylamin abs. werden in 100 ml THF abs. gelöst und bei -10° mit 1,28 ml (13,5 mMol) Chlorameisensäure-äthylester versetzt (Magnetrührer). Nach 10 Minuten werden 1,27 g (13,5 Val) des sauren Kaliumsalzes von Acethydroxamsäure fest hinzugefügt. Der Ansatz wird 2 Stunden bei -10° und dann ohne Kühlung 6 Stunden weitergerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und 4 mal mit je 50 ml THF abs. (ca 40°) extrahiert. Die mit der Reaktionslösung vereinigten THF-Extrakte ergeben nach dem Einengen, Kühlen und Abfiltrieren des kristallinen Niederschlages eine Rohausbeute an ZP 2 von 2,1 gr. Man kristallisiert aus THF abs. um und erhält Watte-artige, langfädige Kristalle. Das Produkt muss trocken und in der Tiefkühltruhe gelagert werden.

Ausbeute: 1,9 gr (53 %)

DC: nur in A chromatographierbar (Hydrolyseempfindlichkeit), trotzdem im Startfleck meist etwas Acethydroxamsäure nachweisbar.

Smp: Umwandlungspunkt: 133 - 135° (vgl. DTA), Smp: typisch 145 - 147°, bester erzielter: 158 - 160°, sehr variabel

Analyse: gef. 59,6% C - 6,4% H - 10,5% N - 23,7% O

ber. 59,2 6,1 10,6 24,2

IR: siehe Kap.18

NMR: siehe Kap.18

DTA: siehe Kap.18

b) mit freigesetzter, wasserfreier Acethydroxamsäure

Es wird gleich verfahren wie unter a). Ansatz 591 mg
2,7 mMol) Bernsteinsäure-monobenzylamid, 370 µl (2,7 mMol)
riäthylamin abs. in 15 ml THF abs., 266 µl (2,7 mMol) Chlor-
meisensäureäthylester und nach 10 Minuten 200 mg Acethydroxam-
äure in 3 ml THF abs. suspendiert.
usbeute: 420 mg (60 %)
nalytische Daten wie unter a)

6.4. Identifikations-Reaktionen mit den ZP 1 und ZP 2

(vgl. Kap.7.3.)

Umsatz mit Benzylamin (Parallelversuche mit ZP1 und ZP2)

Je 50 mg (0,19 mMol) ZP 1 und ZP 2 werden in je 2 ml
HF abs. gelöst und mit je 20,7 µl (0,19 mMol) Benzylamin ver-
etzt.

P 1 : Nach 4 Stunden bei ZT filtriert man 45 mg Kristalle ab, die als Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure identifiziert werden.

Kristalle: Smp: 141 - 146°, Referenz: 143 - 147° Misch-smp: 141 - 146°
Fe-Test +
DC: (B) identischer R_f-Wert zu Referenz
IR: identisch zu Referenz

Im Filtrat weist man als Hauptprodukt im DC Acetylbenzylamid nach.

2 : Man isoliert 40 mg Bernsteinsäure-bis-benzylamid
Smp: 209 - 210°, Referenz: 209 - 210°, Misch-smp: 208-209°
DC: (A) identischer R_f-Wert zu Referenz

Im Filtrat verbleibt Acethydroxamsäure, identifiziert durch DC und positiven Fe-Test.

Umsatz mit Methanol (Parallelversuche)

Je 50 mg ZP 1 und ZP 2 werden in je 5 ml Methanol gelöst und 2 Stunden am Rückfluss gekocht.

ZP 1 : Im DC (A,B) des Reaktionsgemisches findet man noch relativ viel Ausgangsprodukt sowie einen Fleck von Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure (Fe-Test +, in A und B gleiche R_f-Werte wie Referenz).

ZP 2 : Das DC (A,B) zeigt nur wenig Ausgangsprodukt aber viel Bernstein-4-benzylamid-1-methylester und Acethydroxamsäure (Fe-Test +).

Umsatz mit Wasser (Parallelversuche)

Je 50 mg ZP 1 und ZP 2 werden eine Stunde lang in 5 ml Wasser am Rückfluss gekocht.

ZP 1 : Das DC (A,B) lässt noch etwa 50% Ausgangsprodukt, einen Fleck von Bernstein-4-benzylamid-1-hydroxamsäure (Fe-Test +) sowie 2 schwache Nebenprodukte erkennen.

ZP 2 : Das DC (A,B) zeigt kein Ausgangsprodukt mehr, sondern Flecke von Bernstein-4-benzylamid-1-methylester und Acethydroxamsäure (Fe-Test +).

Umsatz mit Diazomethan (Parallelversuche)

Je 50 mg ZP 1 und ZP 2 in je 5 ml MeOH werden bei ZT mit einer ätherischen Diazomethanlösung versetzt.

In beiden Fällen färbt sich die Lösung schon nach den ersten 2 Tropfen gelb und wird auch nach 5 Minuten nicht entfärbt. Man isoliert nur die Ausgangsprodukte.

N-Hydroxysuccinimid reagiert dagegen sofort unter diesen Bedingungen mit Diazomethan (Entfärbung, N_2). Man erhält nach dem Eindampfen der Reaktionslösung und Umkristallisieren aus Chl./Ae

ristalle vom
mp. 108 - 110°
R: 645, 700, 810, 940, 1135, 1210, 1370, 1440, 1700-1750 breit,
2950, 3000
ie genaue Struktur dieses Produkts wurde nicht untersucht.

Saure Totalhydrolyse (Parallelversuche)

Zur Hydrolyse werden je 10 mg ZP 1 und ZP 2 mit 2 ml
n-HCl in Bombenrohre eingeschmolzen und 24 Stunden auf 105°
rhitzt. Das Hydrolysat wird eingedampft, mehrmals mit 2 ml
$_2$O versetzt und wieder eingedampft, in H_2O gelöst und im DC
B) untersucht:
n beiden Fällen wurden im DC Bernsteinsäure (mit Bromkresol-
rün) und Benzylaminhydrochlorid nachgewiesen. Insbesondere wurde
n keinem der Hydrolysate β-Alanin gefunden.

.5. Produkte der thermischen Umlagerung von ZP 1 und ZP 2

1 : Werden 30 mg ZP 1 in einem Mikroreagenzglas auf 170° erwärmt, so findet man im DC (in den Systemen A und B) als Hauptprodukte das stark UV-absorbierende (fluoreszenzlöschende) HOSu sowie Acetylbenzylamid und 2 Nebenprodukte mit einem Anteil von 10 - 20%.
Die saure Totalhydrolyse von 10 mg des Reaktionsgemisches mit 2 ml 6n-HCl im Bombenrohr (24 Stunden, 105°) zeigt im DC Flecke von Bernsteinsäure, Benzylaminhydrochlorid und 10 - 20 % β-Alanin.

2 : 200 mg ZP 2 werden während 40 Minuten auf 170° erwärmt. Durch selektive Kristallisation können die auch im DC

(A,B) nachgewiesenen Verbindungen isoliert und analysiert werden:

aus Wasser: N-Benzylsuccinimid (Smp: 103-104° Lit: 103°, IR identisch zu einem Referenz-Spektrum.

Das wässrige Filtrat wird mit Chl. geschüttelt. Im H_2O-Teil weist man im DC Acethydroxamsäure (Fe-Test +) und HOSu (UV), im Chloroform-Teil Acetylbenzylamid und 5 schwache Nebenprodukte nach.

Durch selektives Auskratzen von Flecken aus der DC-Platte, Extraktion des absorbierten Produkts und Aufnahme eines IR-Spektrums konnte die Identität von Acetylbenzylamid und HOSu mit deren Referenzspektren nachgewiesen werden.

Zur Umlagerungsgeschwindigkeit: siehe Kapitel 17.

16.6. Synthese des ZP 3 (vgl. Kap.7.2.2.)

16.6.1. N'-Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure

5 gr (30 mMol) N-Hydroxyphthalimid werden in 200 ml THF gelöst und mit 3,24 ml (30 mMol) Benzylamin in 50 ml THF versetzt. Die Lösung wird sofort tiefrot und nach einigen Minuten fällt ein dicker Niederschlag (Salz) aus, der sich nach 2-stündigem Rühren bei 30 - 40° wieder auflöst. Die Lösung wird weitere 24 Stunden gerührt, im Vakuum eingeengt und gekühlt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit THF gewaschen. Das Produkt muss kühl aufbewahrt werden. Eine Umkristallisation empfiehlt sich nicht, da dabei das Gleichgewicht wieder zu spielen beginnt.

Ausbeute: 2,73 gr (33 %)

DC: frische Kristalle: einheitlich (A), Fe-Test + . Eine stehengelassene Lösung wird nach 12 Stunden gelb: das DC zeigt neben der Hydrxamsäure wieder die Ausgangsprodukte.
Smp: 104 - 105°
Analyse: gef. 66,3% C - 5,2% H - 10,3% N - 17,6% O
ber. 66,6 5,18 10,4 17,8
IR: 695, 900, 1020, 1320, 1540, 1590, 1630, um 3200 breit.
NMR: 4,45 ppm D, 7,3/7,48 M, 8,73 T breit, 9,7 breit

16.6.2. N'-Benzyl-phthalamid-O(-acetyl-)-hydroxamsäure = ZP 3

a) Acetylierung mit Essigsäureanhydrid

Bei -10° löst man 200 mg (0,74 mMol) N'-Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure in 2 ml Acetanhydrid und lässt 3 Stunden bei dieser Temperatur reagieren. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert, mit kaltem THF abs. gewaschen und bei ZT im Exsiccator über P_2O_5 getrocknet. - Das Produkt muss seiner Unstabilität wegen im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden.
Ausbeute: 45 mg
Smp: 126 - 128°
Analyse: gef. 65,0% C - 5,2% H - 9,2% N - 20,0% O
ber. 65,4 5,2 9,0 20,5
IR: siehe Kap. 18
NMR: siehe Kap.18

b) Acetylierung mit gemischtem Anhydrid von AcOH

Zu einer Lösung von 28,5 µl (0,5 mMol) Essigsäure und 69 µl (0,5 mMol) Triäthylamin abs. in 3 ml THF abs. wird bei -10° 53,5 µl (0,5 mMol) Chlorameisensäureäthylester dosiert (Magnetrührer). Nach 10 Minuten wird dazu eine Lösung von 134 mg (0,5 mMol) N'Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure und 69 µl (0,5 mMol) Triäthylamin abs. in 7 ml THF abs. getropft. Man rührt noch 3 Stunden bei -10° und lässt dann auf ZT ansteigen. Der Niederschlag ($Et_3N \cdot HCl$) wird abfiltriert. Das eingedampfte Filtrat

wird in wenig AcOEt aufgenommen. Daraus kristallisiert beim Kühlen das Produkt. Diese Isolierungs-Methode ist allerdings schwer reproduzierbar und bedarf noch einer Verbesserung
Ausbeute: 40 mg
Smp: 125 - 127°
IR: wie unter a)

c) mit AcOH und DCCI bei -10°

100 mg (0,37 mMol) N'Benzyl-phthalamid-hydroxamsäure, 21 ul (0,37 mMol) Essigsäure und 77 mg (0,37 mMol) DCCI werden in 10 ml THF abs. bei -10° gelöst und stehen gelassen. Im DC (A) nach 5, 10, 20 ... etc Minuten bis 30 Stunden werden nur das Ausgangsprodukt, das ZP 3, DCCI, DCH und 2 Nebenprodukte, aber kein HOPhth, Acetylbenzylamid oder N-Benzyl-phthalamid gefunden.

d) mit AcOH und DCCI bei ZT

Wird derselbe Versuch bei ZT durchgeführt, so findet man im DC schon nach wenigen Stunden auch die unter c) genannten letzten drei Verbindungen.

e) mit AcOH und DCCI bei ZT unter Zusatz von HOPhth

Wird der Versuch d) unter Zusatz von 1 oder 2 Aequivalenten HOSu ausgeführt, so findet man im DC nach 72 Stunden um so weniger Acetylbenzylamid und N-Benzyl-phthalamid, je mehr HOPhth der Reaktion zugesetzt wird.

16.7. Synthese des ZP 4 (vgl. Kap.7.5.)

16.7.1. Bernsteinsäure-monododecylamid

20,2 gr (0,25 mMol) Bernsteinsäureanhydrid werden in 300 ml Chl abs. gelöst. Dazu wird innerhalb von 10 Minuten eine Lösung von 37,7 gr (0,25 mMol) Dodecylamin in 70 ml Chl abs. getropft. Nach weiteren 10 Minuten erfolgt eine spontane Kristallisation des Produkts. Die nach dem Abkühlen filtrierten Kristalle werden aus etwa 300 ml Chl/MeOH/Ae (1:1:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 44,4 gr (79 %)

Smp: 119 - 122°

IR: 710, 1195, 1205, 1330, 1420, 1550, 1640, 1690, 2840, 2910, 3300

16.7.2. Bernstein-4-dodecylamid-1-methylester

11 gr (39 mMol) Bernsteinsäure-monododecylamid werden in 100 ml MeOH gelöst und bei ZT mit ätherischer Diazomethan-Lösung bis zur schwachen Gelbfärbung versetzt. Der Ansatz wird eingedampft, in 100 ml Aether aufgenommen, mit 1n-HCl, H_2O, 10% Bicarbonat-Lösung und H_2O gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf 50 ml eingeengt. Beim Kühlen kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 10 gr (87 %)

Smp: 69 - 71°

IR: 720, 1170, 1330, 1440, 1535, 1640, 1730, 2840, 2905, 3300.

16.7.3. Bernstein-4-dodecylamid-1-hydroxamsäure

Man löst 9 gr (30 mMol) Bernstein-4-dodecylamid-1-methylester in einer Lösung von etwa 2,5 gr (~75 mMol) freiem Hydroxylamin in etwa 12 ml MeOH (siehe Abschnitt 16.1.4.) und lässt den verschlossenen Kolben bei 40° stehen. Die Kristallisation des Produktes setzt schon nach 15 - 30 Minuten ein. Nach 30 Stunden wird der Niederschlag abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7,6 gr (84 %)

DC: (A) einheitlich, Fe-Test +

Smp: 152 - 154°

Analyse: gef. 63,7% C - 10,7% H - 9,8% N - 16,2% O
ber. 64,0 10,7 9,3 16,0

IR: 750, 1005, 1215, 1420, 1470, 1540, 2840, 2910, 3300.

NMR: 0,85 ppm S, 1,22 S, 2,21 M, ca 3,0 M, 7,7 S breit

16.7.4. Bernstein-4-dodecylamid-1-(O-lauroyl-)-hydroxamsäure = ZP

Einer Lösung von 2,0 gr (10 mMol) Laurinsäure und 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin abs. in 60 ml THF abs. werden bei -10° 947 µl (10 mMol) Chlorameisensäureäthylester zugesetzt. Nach 10 Minuten wird über eine Zeit von 15 - 20 Minuten eine vorgekühlte Suspension des Triäthylammoniumsalzes von Bernstein-4-dodecylamid-1-hydroxamsäure in THF abs. zugetropft (3 gr (10 mMol) Hydroxamsäure und 1,39 ml (10 mMol) Triäthylamin in 700 ml THF abs.). Man rührt 3 Stunden bei -10° und 18 Stunden ohne Kühlung. Der gelierte Niederschlag wird abfiltriert und 2 mal kurz mit je 100 ml THF abs. bei ca 60° extrahiert und filtriert. Alle Filtrate werden vereinigt, auf 200 ml eingeengt und gekühlt. Das Rohprodukt wird abgenutscht und aus THF abs. umkristallisiert.

Ausbeute: 3 gr (62 %)

DC: (A) einheitlich

Smp: 148 - 151°

Analyse: gef. 69,3% C - 11,0% H - 6,2% N - 13,4% O
ber. 69,6 11,3 5,8 13,3

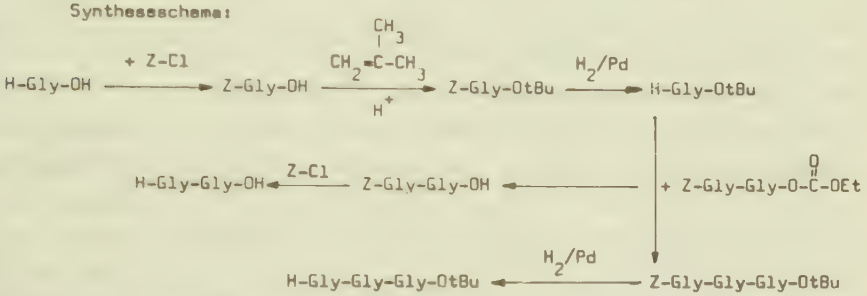
IR: 720, 1100, 1540, 1635, 1690, 1780, 2840, 2910, 3170, 3320.

NMR: es konnte infolge der schlechten Löslichkeit der Verbindung in den gängigen deuterierten LM kein auswertbares NMR gewonnen werden.

16.8. Synthese des ZP 5 (vgl. Kap.7.6.)

16.8.1. Glycyl-glycyl-glycin-tert.Butylester (H-(Gly)$_3$-OtBu)

Synthesesschema:



Die Carbobenzoxylierungen, Kupplungen und Hydrierungen wurden nach den allgemeinen Vorschriften von Greenstein (13) durchgeführt. Es seien deshalb hier nur die wichtigsten Ansätze und Resultate kurz angegeben.

Z-Gly-OtBu wurde nach Anderson (76) aus 15 gr (75 mMol) Z-Glycin und ca 150 ml Isobutylen in 150 ml Methylenchlorid und 1 ml konzentrierter Schwefelsäure durch 84-stündiges Schütteln in einer Druckflasche hergestellt und nach Anderson aufgearbeitet. - Ausbeute: 15,4 gr (77 %). fbl.Oel

H-Gly-OtBu. Hydrierung von 15,4 gr (58 mMol) Z-Gly-OtBu in 150 ml MeOH mit 1,5 gr Palladium auf Kohle (10 %). Dauer ca 8 Stunden bei 30°.
Ausbeute: 5 gr (70 %), farbloses Oel.

Z-(Gly)$_3$-OtBu. Man kuppelt das gemischte Anhydrid aus 10,2 gr (39 mMol) Carbobenzoxy-Glycyl-glycin, 5,35 ml (39 mMol) Triäthylamin abs., 150 ml THF abs. und 3,65 ml (39 mMol) Chlorameisensäureäthylester bei -10° mit 5 gr Glycin-tert.Butylester. Das Produkt kristallisiert beim Einengen und Kühlen aus und wird direkt zur Hydrierung eingesetzt.
Ausbeute: 9,6 gr (67 %)
Smp: 127 - 129°

Glycyl-glycyl-glycin-tert.butylester

6 gr (16 mMol) Z-$(Gly)_3$-OtBu werden in 100 ml MeOH und mit 1,2 gr Palladium auf Kohle (10%) hydriert (ca 5 Stunden bei 30 - 40°). Das Produkt wird aus EtOH/PAe umkristallisiert.
Ausbeute: 3,4 gr (87 %), Plättchen
DC: (B) einheitlich, Nin. +, Tol. +
Smp: Kristallumwandlungspunkt: 66-68°, Smp: 108 - 110°
IR: 740, 850 (t-Bu), 1160, 1235, 1530-50, 1655, 1740, 3330, 3390
NMR: (d-DMSO) 1,40 ppm S, 2,47 S, 3,58 S, 3,72 D, 8,1 M breit.

16.8.2. Carbobenzoxy-glycyl-glycyl-glycin (Z-$(Gly)_3$-OH)

Die Verbindung kann, allerdings mit schlechter Ausbeute, durch Carbobezoxylieren von käuflichem Triglycin hergestellt werden. Aus 5 gr (26 mMol) Triglycin in 13,2 ml 2n-NaOH wurde nach dem Zutropfen von 4,2 ml (32 mMol) Carbobenzoxychlorid in 13,2 ml 2n-NaOH (40 Minuten, 0°), 5-stündigem Rühren bei 0°, Ausäthern und Ansäuern mit 2n-HCl das Rohprodukt erhalten. Es wird aus MeOH umkristallisiert.
Ausbeute: 2,35 gr (28 %)
DC: (B) einheitlich
Smp: 194 - 196°
IR: 700, 1025, 1035, 1165, 1250, 1290, 1550, 1650-60, 1690, 3300, 3340

16.8.3. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-säure

400 mg (1,6 mMol) H-$(Gly)_3$OtBu und 163 mg (1,6 mMol) Bernsteinsäureanhydrid werden bei ZT 17 Stunden in 16 ml Chl. abs. gerührt. Das nach dem Eindampfen zurückbleibende Produkt wird aus EtOH/Ae. umkristallisiert.
Ausbeute: 420 mg (75 %)
DC: (C) einheitlich, Nin. -, Tol. +
Smp: 165 - 167°, Zersetzung (Gasblasen)
Analyse: gef. 48,8% C - 6,7% H - 12,4% N - 32,4% O
ber. 48,7 6,66 12,2 32,5

IR: 840, 1150, 1180, 1210, 1250, 1370, 1555, 1650, 1690, 1720, 1750, 3290, 3330

NMR: (d-DMSO) 1,43ppm S, 2,45 S? T?, 3,73 D, 8,05 M, 11,9 breit

16.8.4. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-methylester

280 mg (0,81 mMol) Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-säure werden in 4 ml MeOH gelöst und bei -10° bis zur schwachen Gelbfärbung mit frischer, 2 mal destillierter ätherischer Diazomethan-Lösung versetzt (zu wenig reines Diazomethan hat unübersichtliche Nebenreaktionen zur Folge.). Die Lösung wird nach 10 Minuten mit einem sehr kleinen Tropfen AcOH entfärbt. Das Produkt kristallisiert bei -10° aus. Es wird aus MeOH/Ae umkristallisiert.

Ausbeute: 150 mg (53 %)

DC: (B) einheitlich

Smp: 165 - 168°

Analyse: gef. 50,1% C - 7,2% H - 11,7% N

ber. 50,1 7,07 11,7

IR: 835, 845, 1030, 1170, 1250, 1370, 1530-50, 1630-45, 1690, 1720-50, 3300

NMR: (d-DMSO) 1,40ppm S, 2,48 T, 3,58 S, 3,71 D, 8,05 M breit

16.8.5. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-hydroxamsäure

720 mg (2 mMol) Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-methylester werden in einem Gemisch von 10 ml MeOH und 10 ml n-Butanol warm gelöst und bei ZT in der Glove-Box mit 650 mg (~ 10mMol) frisch ausgefrorenem freiem Hydroxylamin (vgl. Kap.16.1.4.) versetzt. Man lässt bei ZT 4 Tage stehen, fügt etwas Aether hinzu, kühlt und filtriert das auskristallisierte Rohprodukt ab. Nach 2 weiteren Tagen kristallisiert eine zweite Fraktion. Das Rohprodukt wird 2 mal aus MeOH/Ae umkristallisiert.

Ausbeute: 380 mg (53 %)
DC: (B,C) einheitlich, Fe-Test +
Smp: 178 - 180°
Analyse: gef. 47,0% C - 7,2% H - 15,4% N - 30,4% O
ber. 46,7 6,7 15,5 31,1
IR: 845, 1170, 1230-50, 1550-60, 1640, 3300
NMR: (d-DMSO), 1,40ppm S, 2,3 M, 3,71 D, 8,1 M breit

16.8.6. Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-[O-(carbobenzoxy-triglycyl-)]-hydroxamsäure = ZP 5

a) mit gemischtem Anhydrid von Z-$(Gly)_3$-OH

44,8 mg (0,14 mMol) Carbobenzoxy-triglycin werden in 5 ml Pyridin abs. gelöst und bei -10° mit 13,2 µl (0,14 mMol) Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 5 Minuten wird eine vorgekühlte Lösung von 50 mg (0,14 mMol) Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-hydroxamsäure in 5 ml Pyridin abs. (warm gelöst) zugetropft. - Im DC der Reaktionslösung sind keine Umlagerungsprodukte (HOSu oder Z-$(Gly)_6$OtBu) festzustellen. - Der Ansatz wird 4 Stunden bei -10° und 12 Stunden ohne Kühlung gerührt und bei 50° am HV eingedampft. Der Rückstand wird in 3 ml Chl. abs. suspendiert ($^1/_2$ h), filtriert und auf dem Filter mit 5 ml 40° warmem THF abs. gewaschen.
Ausbeute: ca 80 mg
DC: Das Produkt enthält noch etwas Hydroxamsäure und Z-Tripeptid.
Smp: um 200°, spontane Verkohlung
IR: siehe Kap. 18
DTA: siehe Kap. 5.6.4.
Erhitzt man eine Probe dieses Produkts 12 Minuten lang auf 150°, so kann man im DC HOSu (in B, UV) und Z-$(Gly)_6$-OtBu (in B und C) nachweisen.

b) mit DCCI

26,7 mg (0,083 mMol) Carbobenzoxytriglycin, 29,8 mg (0,083 mMol) Bernstein-4-(-diglycyl-glycin-tert.butylester)-1-hydroxamsäure 17,1 mg (0,083 mMol) DCCI werden bei ZT in 5 ml

Pyridin abs. gelöst. Nach 5 Stunden beginnt DCH auszukristallisieren. Er wird nach 24 Stunden abfiltriert. - Im DC der Reaktionslösung sind ebenfalls keine Umlagerungsprodukte nachweisbar.- Der Ansatz wird bei 50° am HV eingedampft und der Rückstand mit 2 ml THF abs. ausgewaschen. Rückstand: 25 mg.
Das Produkt ist noch mit den Ausgangsprodukten und DCH verunreinigt. Wird eine Probe davon 12 Minuten auf 150° erwärmt, so können danach trotzdem die Umlagerungsprodukte HOSu und $Z\text{-}(Gly)_6$-OtBu nachgewiesen werden.

Ein entsprechender Ansatz mit DCCI, der bei ZT 228 Stunden stehen gelassen wurde, zeigte im DC auch nach dieser Zeit keine Umlagerungsprodukte.

16.9. Versuche mit ACTH-Peptid-Sequenzen (vgl. Kap.7.7.)

Es seien hier zu jedem der im Reaktionsschema des Kapitels 7.7. aufgeführten Schritte A bis G kurz die typischen Reaktionsbedingungen aufgeführt und das Resultat kommentiert. Zur Reaktionsüberwachung war aus den im theoretischen Teil aufgeführten Gründen praktisch nur die DC brauchbar. Alle Versuche wurden unter im einzelnen nicht geschilderten verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

Weg A Umsatz von Bernsteinsäureanhydrid mit H-ACTH-11-24-OtBu·2HCl

Zwei Lösungen von 1,96 gr (0,9 mMol) H-ACTH-11-24-OtBu·2HCl in 20 ml Pyridin abs. bzw. 90,0 mg (0,9 mMol) Bernsteinsäureanhydrid in 10 ml Pyridin abs. werden bei 0° vereinigt,

3 Stunden gerührt und weitere 18 Stunden bei ZT gerührt. Der Ansatz wird bei 40° im Vakuum auf 4 ml eingedampft. Auf Zusatz von 25 ml Ae fällt das Produkt aus, wird abfiltriert und bei ZT 15 Stunden am HV über P_2O_5 getrocknet. (Kristallisationsversuche ergaben immer nur Oele, während die schnelle Fällung mit Ae ein festes Produkt liefert.).

Ausbeute: 1,82 gr (89 %)

DC: (C) bei R_f = 0,5 ein Hauptfleck (Nin -, Tol +), 3 schwache Nebenprodukte, kein Nin + Fleck von Ausgangsprodukt (R_f=0,4) mehr sichtbar.

Analyse: des Produktes:	gef.	55,7% C	4,8% H	3,0% Cl	14,5% N	21,5% O
	ber.	55,4	7,9	3,05	14,7	18,9
zum Vergleich: H-ACTH-11-24-OtBu	gef.	54,3% C	8,2% H	3,1% Cl	15,5% N	21,0% O
	ber.	55,6	8,1	3,25	15,4	17,6

IR: Die IR-Spektren des Produkts und von H-ACTH-11-24-OtBu sind praktisch identisch 1165, 1245, 1365, 1390, 1440, 1505-35, 1630-50, 2960, 3300

NMR: Auch die NMR-Spektren von Ausgangs- und Endprodukt gleichen einander stark; sie sind nicht interpretierbar.

Diese Reaktion ist am befriedigendsten verlaufen.

Weg B Umsatz des Produkts aus Weg A mit Diazomethan

Der Umsatz von 200 mg (0,088 mMol) des Produkts aus Weg A in 20 ml MeOH bei 0° mit ätherischer Diazomethan-Lösung erfolgt sehr langsam. Das Diazomethan wird jeweils nach einigen Stunden mit AcOH zerstört und durch frisches ersetzt. Die Lösung kann nach einiger Zeit aber nicht mehr ganz entfärbt werden. Mit Aktivkohle kann sie aufgehellt werden. Wird das Produkt nach 192 Stunden durch Aether ausgefällt, so findet man im DC einen zu ca 80 % erfolgten Umsatz zu einer Verbindung mit R_f = 0,6 (C, Tol +, Nin -), daneben das Ausgangsprodukt und schwache Nebenprodukte.

Weg C Mit der Thionylchlorid-Methanol-Veresterungsmethode nach Brenner (73), bei der zum Schutz der tert. Butylester bei -10° gearbeitet werden muss, findet man nach 50-stündiger Reaktion im DC nur das Ausgangsprodukt.

Weg D Versucht man mit O-Methyl-N,N'-dicyclohexyl-isoharnstoff nach Vowinkel (31) zu verestern, so findet man nach über 90-stündiger Reaktion bei ZT ebenfalls nur Ausgangsprodukt.

Weg E Wird das Produkt aus Weg A in Pyridin abs. mit 1 Aequivalent Triäthylamin abs. mit Chlorameisensäureäthylester aktiviert und nach 10 Minuten ein grosser Hydroxylamin-Ueberschuss zugesetzt, so erhält man nach dem Ausfällen mit Aether ein Produkt, das zu 60 - 70% aus einer Hydroxamsäure (R_f = 0,45 in C, Fe-Test +), zu etwa 30% aus Ausgangsprodukt und zu etwa 5% wahrscheinlich aus dem Methyl- oder Aethyl-Ester-Derivat sowie einigen Nebenprodukten besteht.

Weg F Wird ein nach Weg A→B oder nach G gewonnener Methylester bei ZT oder 40° mit einem Ueberschuss an Hydroxylamin in MeOH oder MeOH/n-Bu-OH umgesetzt, so erhält man je nach Bedingungen bis zu etwa 80% ebenfalls eine Hydroxamsäure vom R_f = 0,45 (C), dazu aber noch mehr Nebenprodukte als nach Weg E.

Weg G Werden 3 Aequivalente Bernsteinsäure-monomethylester in Pyridin abs. und 3 Aequivalente Triäthylamin abs. mit 3 Aeq. Chlorameisensäureäthylester aktiviert und mit einem Aeq. H-ACTH-11-24-OtBu versetzt, so erhält man bis zu etwa 90% ein Produkt mit gleichem R_f (0,6 in C) wie nach Weg B.

Reinigung: Die Reinigung einer nach Weg A→E gewonnenen Hydroxamsäure wurde auf einer Kieselgelsäule versucht. Da die Verbindung darauf offenbar sehr stark adsorbiert wird, konnte sie nur mit sehr schlechter Ausbeute (~ 5%) gewonnen werden. Ein Nebenprodukt wurde überdies nicht vollständig abgetrennt.

"Kupplung" von nach Weg E oder F gewonnenen Hydroxamsäuren mit BOC-ACTH-1-10-OH

a) mit gemischtem Anhydrid:

Die Aktivierung von BOC-ACTH-1-10-OH mit Chlorameisensäureäthylester führt wahrscheinlich hauptsächlich zu Nebenprodukten (vgl. Kap. 7.6.). Jedenfalls sind weder nach der Kupplung, noch beim Erhitzen des Produktgemisches 30 Minuten auf 100° und 150° die Umlagerungsprodukte HOSu oder BOC-ACTH-1-24-OtBu zu finden.

b) mit DCCI:

Zur Kupplung wurden sowohl Rohprodukte wie auch die gereinigte Hydroxamsäure verwendet. Die Reaktion wurde auch unter den genauen Bedingungen durchgeführt, wie sie zur Wünsch-Kupplung dieses Peptids (34) angewandt werden. In keinem Fall findet man im DC ein eindeutiges neues Hauptprodukt. Insbesondere kann aber, auch nach Reaktionszeiten bis zu 10 Tagen (ZT), beim Erhitzen der gewonnenen Produkte auf 100 - 150° oder beim Belichten durch UV kein HOSu bzw. BOC-ACTH-1-24-OtBu nachgewiesen werden.

17. Die Umlagerungen der ZP 1 - 5 .

Die thermischen Umlagerungen wurden in der folgenden Weise untersucht:

Je 5 mg des betreffenden ZP's wurden in 4 Schmelzpunktsröhrchen von etwa 2,5 mm Durchmesser eingewogen. Dazu wurden, falls erforderlich, mit einer Gaschromatographen-Spritze je 50 µl eines Lösungsmittels dosiert. Danach wurde das Röhrchen zugeschmolzen; die Substanz-Seite muss dabei in Eis gekühlt werden. Anschliessend wurden die Röhrchen auf einem vorgewärmten und auf konstanter Temperatur gehaltenen Koflerblock während 3, 6, 12 und 24 oder 4, 8, 16 und 32 Minuten geheizt und danach in einem kleinen Kochglas aufgebrochen. Die auf Zusatz von 1 ml Lösungsmittel (ZP 1-4: THF abs. , ZP 5: DMF* abs.) erhaltene Stammlösung wurde zum Auftragen von je 10, 20 und 40 % auf ein Dünnschichtchromatogramm verwendet. Als Fliessmittel wurden jenachdem A,B oder C verwendet.

Die Beurteilung des Reaktionsfortschritts mit der Zeit erfolgte durch Vergleich der entwickelten und durch Cl_2/Tolidin oder $FeCl_3$/0,5n HCl angefärbten Flecke mit den ebenfalls aufgetragenen Konzentrationsreihen von Referenz-Ausgangs- bzw. -Umlagerungsprodukten. Die absoluten Umlagerungszeiten sind nach dieser Methode um einen Faktor 2 zu gross oder zu klein.

Der eine Vorversuch zur Umlagerung durch UV wurde durch Bestrahlen einer DC-Platte bzw. der aufgetragenen Substanzflecke im Abstand von 12 cm vor einem Hg-Hochdruckbrenner mit Quarzwassermantel durchgeführt. Die DC-Platte wurde vorher im Trockenschrank 1/2 Stunde lang bei 110° getrocknet; nach dem Abkühlen wurden die Reaktions- und Vergleichs-Lösungen aufgetropft und belichtet.

Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Legende zur nachfolgenden Tabelle

v_{rel}: relative Umlagerungsgeschwindigkeit. Die Geschwindigkeiten werden auf das ZP 1 bei 170° bezogen, für das $v_{rel}=1$ definiert wird. Die Umrechnung auf die anderen Temperaturen erfolgte mit Hilfe der RG-T-Regel (siehe Kap. 5.6.2.). Die Werte sind gerundet, da sie ohnehin nur als Anhaltspunkte dienen können.

Produkte: Die mit + markierten Produkte wurden bei den entsprechenden Umlagerungen im DC nachgewiesen.

HOSu: Im Falle des ZP 3 ist HOPhth gemeint.

Amid: Das aus der thermischen Umlagerung hervorgehende, immer zusammen mit HOSu auftretende Amid R-CONH-R' (vgl. die Hypothesen 2a und 2b).

Imid: Im Falle des ZP 3: N-Benzyl-phthalimid. Bei den übrigen ZP: N-substituiertes Succinimid.

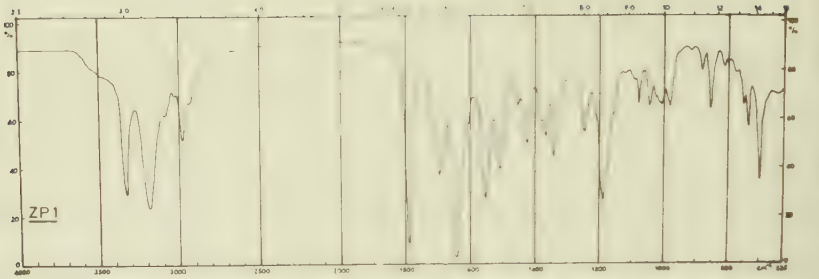
Hdrx: Die aus der Säuregruppe hervorgehende Hydroxamsäure RCONHOH

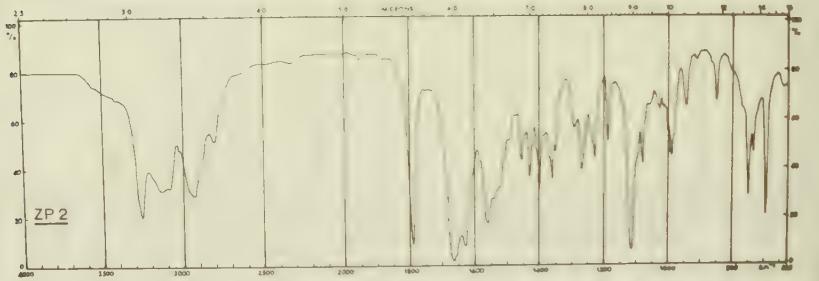
Neben: Anzahl im DC beobachteter, nicht identifizierter Nebenprodukte.

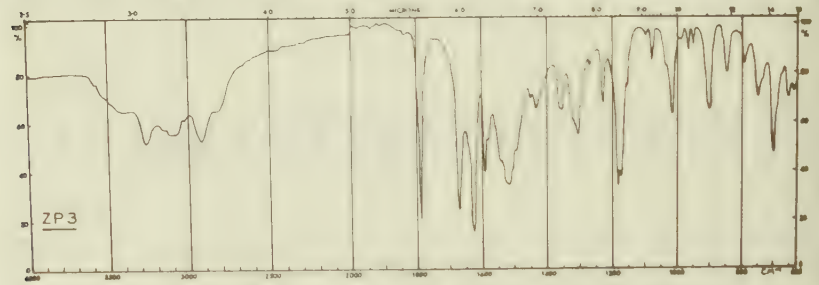
	Temp.	Lösungsmittel	ZP verschwindet: zu:	in:	v_{rel}	Produkte: HOSu	Amid	Imid	Hdrx	Neben
ZP 1	23°	THF	0%	14 Tage		-	-	-	-	
	23°	THF + 1 Aequiv. t-BuOK	0%	1 h		-	-	-	-	
	23°	THF + 1 Aequiv. t-BuOK	0%	16 h		-	-	∂		
	23°	THF + 1 Aequiv. BF_3/Ae	0%	2 h		-	-	∂		
	23°	AcOH	0%	9 Tage		-	-			
	170°	-	100%	12 Min	1	+	+	-	-	2
	145°	-	50%	32 Min	1	+	+	-	-	1
	120°	-	<5%	32 Min		∂	∂	-	-	
	145°	THF	50%	32 Min	1	+	+			2
	145°	$CHCl_3$	50%	32 Min	1	+	+			
ZP 2	23°	THF	0%	7 Tage		-	-	-	∂	
	170°	-	100%	12 Min	1	+	+	+	+	2
	145°	-	50%	32 Min	1	∂	∂	+	+	2
	120°	-	5%	32 Min		-	-	∂	∂	1
	145°	THF	25%	32 Min	0,5	∂	∂	+	+	2
	145°	$CHCl_3$	25%	32 Min	0,5	-	-	+	+	2
ZP 3	23°	THF	20 - 40%	7 Tage		+	+	+	+	2
	23°	THF	70 - 90%	14 Tage		+	+	+	+	2
	100°	THF	100%	3 - 6 Min	250	+	+	+	+	1

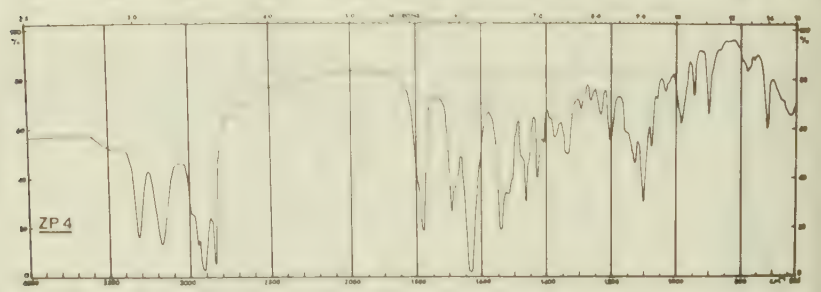
	Temp.	Lösungsmittel	ZP verschwindet: zu:	in:	v_{rel}	Produkte: HOSu	Amid	Neben
ZP 4	23°	THF	0%	14 Tage		-	-	-
	100°	-	<10%	24 Min		δ	δ	-
	150°	-	100%	12 Min	4	+	+	3
	150°	n-Heptan	100%	24 Min	2	+	+	2
	150°	$CHCl_3$	100%	24 Min	2	+	+	3
	150°	Dimethylformamid	≤50%	24 Min	<1	+	+	5
	150°	Dimethylsulfoxyd	≤50%	24 Min	<1	+	+	2
	150°	CH_3OH	~50%	24 Min	~1	+	+	3
	150°	Formamid	100%	24 Min	2	+	+	6
	150°	THF	~25%	24 Min	~0,5	+	+	3
	150°	THF : H_2O 3 : 1	25%	24 Min	0,5	+	+	3
	150°	THF : H_2O 1 : 1	50%	24 Min	1	+	+	3
	150°	THF : H_2O 1 : 3	100%	24 Min	2	+	+	3
	150°	H_2O	100%	24 Min	2	+	+	3
	150°	Et-N-(Isopropyl)$_2$	100%	6 Min	8	+	+	4
	100°	Et-N-(Isopropyl)$_2$	<20%	24 Min		+	+	3
	23°	UV-bestrahlt (s. oben)	<20%	270 Min		+	+	1
ZP 5	23°	Dimethylformamid	0%	14 Tage		-	-	
	150°	-	100%	6 Min	8	+	+	1

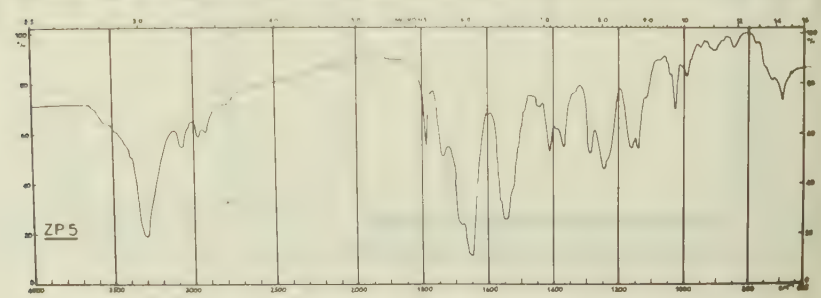
18. Spektren


ZP1


ZP2


ZP3


ZP4


ZP5

Zusammenfassung

Beim Studium der heute vorliegenden Erfahrungen mit dem neuen Peptid-Kupplungsverfahren von Wünsch gelangt man zur Erkenntnis, dass die bisher in der Literatur diskutierten Mechanismen als Interpretationsgrundlage nicht genügen. Deshalb wurden eine erweiterte und drei neue Hypothesen zum Reaktionsmechanismus aufgestellt, die insbesondere der experimentell (osmometrisch und viskosimetrisch) an einigen Beispielen beobachteten Assoziationsfähigkeit auch kleiner und mittlerer Peptide Rechnung tragen.

Die experimentelle Ueberprüfung dieser Hypothesen führt zu folgenden Ergebnissen:

- Das Produkt aus HOSu und DCCI (Succinimido-oxycarbonyl-β-alanin-hydroxysuccinimid-ester) hat mit den guten Eigenschaften des Wünsch-Systems nichts zu tun; es ist lediglich ein unerwünschtes Nebenprodukt.

- Die Protonierung von O-Acyl-Lactimen erscheint aufgrund konduktometrischer Versuche an N,N'-Dicyclohexyl-O-äthyl-isoharnstoff als möglich.

- Durch Nucleophile kann der HOSu-Ring im Wünsch'schen Reaktionsmilieu geöffnet werden.

- Eine geforderte neuartige intramolekulare Umlagerung von gemischten Anhydriden aus einer Amid-N-substituierten Succinamid-hydroxamsäure (oder dem entsprechenden Phthalsäure-Derivat) und einer Carbonsäure in HOSu und ein Amid wurde an 5 synthetisierten derartigen Modellverbindungen nachgewiesen. Sie erfolgt aber, ausser beim Phthalsäure-Modell, erst bei höheren Temperaturen oder bei UV-Bestrahlung und verläuft nicht einheitlich. Man beobachtet auch die inverse Umlagerung in N-substituierte Succinimide (bzw. Phthalimide) und Hydroxamsäure, sowie die bekannte Lossen-Umlagerung.

Die Diskussion der experimentellen Befunde führt zur Ablehnung jener drei Hypothesen, deren typisches Charakteristikum eine Folge von diskreten, chemischen Reaktionsschritten ist. - Nicht ausgeschlossen erscheint das Vorliegen eines synchronen Prozesses; die betreffende Hypothese möge als Diskussionsbeitrag gewertet werden.

Literaturverzeichnis

1 Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", 4.Aufl., Bd.8 Seite 178 und Band 11/2 Seite 7

2 De Los F.De Tar, F.Silverstein, J.Am.Chem.Soc.88, 1013 (1966)

3 De Los F.De Tar, F.Silverstein, J.Am.Chem.Soc.88, 1020 (1966)

4 De Los F.De Tar, F.Silverstein, J.Am.Chem.Soc.88, 1024 (1966)

5 E.Vowinkel, Chem. Ber. 99, 42 (1966)

6 H.G.Khorana, Chem. Reviews 53, 145 (1953)

7 E.Schnabel, Annalen 688, 238 (1965)

8 M.Bergmann, H.Kösler, Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem.159, 179 (1926)

9 M.Bergmann, L.Zervas, Biochem. Z. 203, 280 (1928)

10 H.Schüssler, H.Zahn, Chem.Ber. 95, 1076 (1962)

11 M.Smith, J.G.Moffath, H.G.Khorana, J.Am.Chem.Soc.80, 6204 (1958)

12 L.Kisfaludi, M.Löw, "Proc. of the 5th. Europ.Pept.Symp. Oxford 1962", Pergamon Press 1963, Seite 93

13 J.P.Greenstein, M.Winiwitz, "Chemistry of the Amino Acids" Vol.2, J.Wiley, NY, 1961

14 E.Schröder, K.Lübke, "The Peptides", Academic Press 1965

15 G.T.Young, J.H.Jones, Chem. Comm. 1967, 35

16 S.Rajappa, K.Nagarajan, V.S.Iyer, Tetrahedron 23, 5805 (1967)

17 T.R.Gorindachari, S.Rajappa, A.S.Akerbar, V.S.Iyer, Tetrahedron 23, 4811 (1967)

18 G.W.Anderson, J.E.Zimmermann, F.M.Callahan, J.Am.Chem.Soc. 86, 1839 (1964)

19 H.Jeschkeit, Z.Chemie 8, 20 (1968)

20 G.H.I.Nefkens, G.I.Tesser, J.Am.Chem.Soc. 83, 1263 (1961)

21 G.H.I.Nefkens, G.I.Tesser, R.J.F.Rivard, Rec.Trav.chim. Pays Bas 31, 683 (1962

22 A.J.Hubert, R.Buyle, B.Hargitay, Helv. 46, 1429 (1963)

23 F.Weygand, D.Hoffmann, E.Wünsch, Z.Naturforsch. 21b, 426 (1966)

24 E.Wünsch, F.Drees, Chem.Ber. 99, 110 (1966)

25 M.Brenner, "Critical Evaluation of Coupling Methods", Vortrag am 10. Peptid Symposium in Nordwijk,Holland, 1967

26 M.Brenner, Z.f.naturw.u.med.Grundlagenforsch. 1, 169 (1963)

27 F.Weygand, U.Ragnarsson, Z.Naturforsch. 21b, 1141 (1966)

28 F.Weygand, D.Hoffmann, A.Prox, Z.Naturforsch. 23b, 279 (1968)

29 F.Weygand, L.Schmidhammer, W.König, Angew.Chem. 75, 285(1963)

30 J.E.Zimmermann, G.W.Anderson, J.Am.Chem.Soc. 89, 7151 (1967)

31 E.Vowinkel, Chem.Ber. 99, 1469 (1966)

32 E.Schmidt, F.Moosmüller, Annalen 597, 237 (1955)

33 Persönliche Mitteilungen von Herrn Dr. E.Wünsch, München

34 Persönliche Mitteilungen von Herrn Dr. B.Iselin, CIBA AG, Basel

35 W.Simon, C.Tomlinson, Chimia 14, 301 (1960)

36 I.van Dam, Rec.Trav.chim.Pays Bas 83, 129 (1964)

37 M.Goodman, E.S.Schmitt, D.A.Yphantis, J.Am.Chem.Soc. 84, 1288 (1962)

38 B.Miličević, G.Eigenmann, Helv. 47, 1039 (1964)

39 R.G.Hiskey, A.I.Dennis, Anal.Lett. 1, 221 (1968)

40 R.R.Röpke, H.L.Mason, J.BiolChem. 133, 103 (1940)

41 Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie" 4.Aufl. 1965. Bd.3/1, Seite 431

42 P.Doty, A.Holzer, J.Am.Chem.Soc. 78, 947 (1956)

43 J.W.Breitenbach, K.Allinger, A.Koref, Monatshefte f.Chemie 86, 269 (1955)

44 H.Batzer, "Einführung in die makromolekulare Chemie" Dr.A.Hünig-Verlag Heidelberg 1958, Seite 142

45 M.Löw, L.Kisfaludi, Acta.chim.Hung. 44, 61 (1965)

46 H.Gross, L.Bilk, Tetrahedron 24, 6935 (1968)

47 H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams, "Mass Spectroscopy", Holden-Day, 1967

48 G.Spitteler "Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen" Verlag Chemie, 1966, Seite 135

49 F.Weygand, W.Steglich, N.Chytil, Z.Naturforsch. 23b, 1391 (1968)

50 M.Brenner, W.Hofer, Helv.44, 1794 (1965)

51 K.Nagarajan, S.Rajappa, V.S.Iyer Tetrahedron 23, 1049 (1967)

52 E.Vowinkel, Chem.Ber. 99, 42 (1966)

53 E.Wünsch, E.Jaeger, Hoppe Seyler's Z.f.physiol.Chem.346, 301 (1966)

54 C.D.Hurd, D.G.Botteron, J.org.Chem. 11, 207 (1946)

55 P.G.Sammes J.org.Chem. 1965, 6608

56 J.Pless in "Peptides, Proceedings of the 5th Europ.Pept. Symp.", Oxford 1962, Seite 69

57 H.Lechner, J.Hoffmann, Chem.Ber. 55, 912 (1922)

58 G.H.L.Nefkens, Nature 193, 974 (1962) und G.H.L.Nefkens, G.I.Tessner, R.J.F.Rivard, Rec.Trav.Chim. Pays Bas 79, 688 (1960)

59 E.Wünsch, A.Zwick, G.Wendelberger, Chem.Ber. 100, 173 (1967)

60 E.S.Gould, "Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie", Verlag Chemie, 1962, Seite 390 ff.

61 G.Nemethy, Angew.Chem. 79, 260 (1967)

62 E.E.Schrier, M.Prottle, H.A.Scheraga, J.Am.Chem.Soc. 86, 3444 (1964)

63 P.Mukerjee, J.physic.Chem. 69, 2821 (1965)

64 D.Eagland, E.Franks, Transact. of the Farad.Soc. 61, 2468 (1965)

65 S.Hünig, M.Kiessel, Chem.Ber. 91, 380 (1958)

66 J.D.Kopple, "Peptides and Amino Acids", W.A.Benjamin Inc., 1966, Seite 82 ff.

67 Diss. E.Voegelin, Universität Basel, 1969

68 M.Brenner, A.Niederwieser, Experientia 16, 378 (1960)

69 M.Brenner, A.Niederwieser, G.Pataki, Experientia 17, 145 (1961)

70 E.Stahl, "Dünnschichtchromatographie", 2.Auflage 1967, Springer Verlag

71 Diss. P.Fankhauser, Universität Basel, 1969

72 R.Schwyzer, H.Kappeler, Helv. 46, 1550 (1963)

73 M.Brenner, W.Huber, Helv. 36, 1109 (1953)

74 R.Schwyzer, B.Iselin, Helv. 41, 1273 (1958)

75 F.Weygand, A.Röpsch, Chem.Ber. 92, 2095 (1959)

76 G.W.Anderson, F.M.Callahan, J.Am.Chem.Soc.82, 3359 (1960)

77 D.R.Robinson, W.P.Jencks, J.Am.Chem.Soc.87, 2462 (1965)

78 D.R.Robinson, W.P.Jencks, J.Am.Chem.Soc.87, 2470 (1965)

79 B.Nagy, W.P.Jencks, J.Am.Chem.Soc.87, 2480 (1965)

80 B.Vollmert "Grundriss der Makromolekularen Chemie", Springer, 1962

81 M.Eigen, Angew.Chem. 75, 489 (1963)

82 A.I.Vogel, "Pracical Organic Chemistry", Longmanns, London, 1961, Seite 163

83 M.Brink, E.Larsson, Tetrahedron 25, 5611 (1969).

Curriculum vitae

Als Sohn des Kurt Hofer sen., Chemiker, aus Strengelbach (AG) und der Louise, geb. Piccolo, wurde ich, Kurt Hofer jun. am 24.Februar 1942 in Basel geboren.

In Münchenstein (BL) besuchte ich die Primarschule und anschliessend das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium in Basel, wo ich 1961 die Maturitätsprüfung Typus C bestand.

Im Sommersemester 1961 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach und Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Zoologie als Nebenfächer. Im Oktober 1962 bestand ich das erste Vordiplom (anorganische Chemie, organische Chemie, Mathematik), im Oktober 1962 das zweite Vordiplom (Physik, Zoologie) und im Oktober 1965 das Diplomexamen.

Die vorliegende Arbeit begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Brenner im November 1965.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Dozenten:

E.Baldinger, H.Balli, E.Baumgartner, M.Brenner, P.Buchner, P.Diehl, H.Erlenmeyer, S.Fallab, C.Grob, F.Grün, P.Huber, W.Kuhn, P.Leepin, E.Miescher, M.Monnier, H.Nüesch, A.Portmann, B.Prijs, T.Reichstein, P.Scherrer, P.Schmid, H.Seiler, Ch.Tamm, M.Thürkauf, R.Wizinger, I.Zschokke, R.Zürcher.